



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

MODELOVÁNÍ DYNAMIKY BUNĚČNÝCH KOLONIÍ

MODELLING OF CELL COLONY DYNAMICS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Stanislav Bělehrádek

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Ing. Karel Sedlář

BRNO 2017

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Student: Bc. Stanislav Bělehrádek

ID: 155563

Ročník: 2

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Modelování dynamiky buněčných kolonií

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Zpracujte literární rešerši o základních intra a intercelulárních signálech, které řídí časovou a prostorovou dynamiku růstu buněčných kolonií. 2) Prostudujte možnosti využití různých kvantitativních i kvalitativních technik modelování pro dynamické modelování růstu buněčných kolonií. 3) Navrhněte a ve vhodném prostředí implementujte základní model růstu buněk založený na řízení buněčného cyklu. 4) Model rozšířte o zvolené parametry intracelulární kinetiky genových regulačních sítí nebo signálních drah, které implementujte jako uživatelské vstupy modelu. 5) Chování modelu otestujte pro různé kombinace vstupních parametrů a model porovnejte s jinými modely z veřejných databází. 6) Proveďte diskusi a zhodnocení výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] KHOLODENKO, Boris N. Cell-signalling dynamics in time and space. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2006, 7 (3), s. 165-176.

[2] CYTOWSKI, Maciej a Zuzanna SZYMANSKA. Large-Scale Parallel Simulations of 3D Cell Colony Dynamics. Computing in Science. 2014, 16 (5), s. 86-95.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 19.5.2017

Vedoucí práce: Mgr. Ing. Karel Sedlář

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Obsahem diplomové práce je popis intracelulárních procesů zodpovědných za řízení buněčného cyklu a reakce buněk na vnější i vnitřní podněty. Popsány jsou důležité signální dráhy a metody, kterými je lze simulovat *in silico*. Z popsáných buněčných dějů je vytvořen model buněčného cyklu, který je implementován do nástroje naprogramovaném v C++ s využitím OpenGL pro vizualizaci. Model je otestován pro různé buněčné procesy a pro růst buněk HeLa. Výsledky jsou nakonec porovnány s chováním živých buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA

Buňka; buněčný cyklus; buněčná kolonie; intercelulární dynamika; modelování; počítačová simulace; systémová biologie; tumorigeneze; vizualizace

ABSTRACT

The content of the thesis is a description of intracellular processes responsible for cell cycle regulation and reactions of cells to external and internal stimuli. Thoroughly described are important signaling pathways with appropriate methods, which can be used to simulate them *in silico*. From these cellular processes, a cell cycle model is created and implemented in a tool programmed in C++ with OpenGL used for visualization. The model is then tested for various cell processes including HeLa cells growth. Finally, the results are compared with the behavior of living cells.

KEYWORDS

Cell; cell cycle; cell colony; intercellular dynamics; modeling; computer simulation; system biology; tumorigenesis; visualization

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Modelování dynamiky buněčných kolonií jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce Mgr. Ing. Karlu Sedláři za cenné rady, odbornou pomoc na konzultacích, a hlavně za trpělivost. Děkuji také své rodině a přátelům, kteří mi byli při vypracovávání práce oporou.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

BĚLEHRÁDEK, S. *Modelování dynamiky buněčných kolonií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 86 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Ing. Karel Sedlář.

OBSAH

Úvod.....	1
1 Řízení buněčného cyklu	2
1.1. Fáze buněčného cyklu.....	2
1.2. Kontrolní body.....	4
2 Signální dráhy.....	5
2.1. Signální dráhy ovlivňující buněčnou proliferaci	6
2.2. Intercelulární dynamika buněčných kolonií.....	13
3 Techniky modelování buněčných kolonií	17
3.1. Kvantitativní metody	18
3.2. Kvalitativní metody	19
3.3. Modelování intercelulární dynamiky	22
3.4. Grafická reprezentace modelů.....	24
4 Model buněčné kolonie	25
4.1. Vytvoření modelu buněčného cyklu	25
4.2. Model signálních drah.....	28
4.3. Definice prostoru v modelu	36
4.4. Model pohybu buněk	38
4.5. Vytvoření programu pro vizualizaci modelu	41
5 Testování modelu	45
6 Závěr	63
7 Seznam použité literatury.....	64
8 Seznam použitých zkratk.....	71
9 Seznam příloh.....	72

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Fáze buněčného cyklu s vyznačenými kontrolními body	2
Obr. 2 - Aktivita cyklin-CDK komplexů v buněčném cyklu, upraveno z [4]	3
Obr. 3 - Aktivace a deaktivace fosforylací a defosforylací, upraveno z [6]	6
Obr. 4 - Metabolické dráhy PI3K/Akt a HIF1, zjednodušeno z [18]	8
Obr. 5 - MAPK/ERK signální dráha, upraveno z [22]	9
Obr. 6 - Signální dráha Hippo, zjednodušeno z [27]	11
Obr. 7 - Diagram způsobu regulace velikosti orgánů, upraveno z [28]	12
Obr. 8 - Buňky zdravé a podstupující apoptózu (vpravo), převzato z [31]	13
Obr. 9 - Schéma přenosu EGF přes extracelulární prostředí, upraveno z [34]	14
Obr. 10 - Pohyb buňky po substrátu (pevné podložce)	15
Obr. 11 - Vyznačené skupiny buněk melanomu pohybující se k cévě, převzato z [45]	16
Obr. 12 - 3D model tumoru rostoucího ve zdravé tkáni, převzato z [47]	17
Obr. 13 - Příklad modelu (A), příslušných ODE (B) a koncentrací (C), převzato z [53]	18
Obr. 14 - Příklad zakreslení navázání ligandu na receptor do PS, upraveno z [61]	19
Obr. 15 - Zobrazení dvourozměrného modelu tumoru, převzato z [52]	24
Obr. 16 - Odezva HIF1 na pokles množství kyslíku	31
Obr. 17 - Aktivita HIF1 v závislosti na koncentraci kyslíku, převzato z [70]	31
Obr. 18 - Odezva na růstový faktor při různé rychlosti odvádění metabolitů	32
Obr. 19 - Odezva na růstový faktor při různém množství dostupných živin	33
Obr. 20 - Rozdíl mezi vypočtenými a reálnými velikostmi buněk v modelu	34
Obr. 21 - Zobrazení modelů rozložení látek v prostoru: a) plocha, b) céva, c) bod	37
Obr. 22 - Znázornění pohybu modelovaných buněk	38
Obr. 23 - Energie pohybu v závislosti na vzdálenosti od membrány	40
Obr. 24 - Testovaný model pohybu buněk	40
Obr. 25 - Řez simulovanou kolonií s tumorem, výpis z příkazového řádku	42
Obr. 26 - Spouštění simulace z příkazového řádku	44
Obr. 27 - Režim p1 po a) 2 000, b) 6 000, c) 10 000 iteracích a na konci simulace (d)	46
Obr. 28 - Změna počtu buněk, režim p1, plošný zdroj látek	46

Obr. 29 - Závislost r a p buněk na vzdálenosti od plošného zdroje živin, režim p1	47
Obr. 30 - Řez tumorem ve tkáni, bodový zdroj látek	48
Obr. 31 - Změna počtu buněk, režim p1, bodový zdroj látek.....	48
Obr. 32 - Závislost r a p buněk na vzdálenosti od bodového zdroje živin, režim p1	49
Obr. 33 - Režim p2 po a) 8 000, b) 10 000, c) 12 000 iteracích a (d) na konci simulace	50
Obr. 34 - Změna počtu buněk, režim p2	50
Obr. 35 - Závislost r a p buněk na vzdálenosti od zdroje živin, režim p2	51
Obr. 36 - Řez kolonií v iteraci a) 7 000, b) 9 200 a c) na konci simulace	52
Obr. 37 - Změna počtu buněk, režim p3	53
Obr. 38 - Příliš vysoký rozsah poškození při tvorbě dutiny	53
Obr. 39 - Závislost r a p buněk na vzdálenosti od zdroje živin, režim p3	54
Obr. 40 - Režim p4: a) před a b) po reaktivaci, c) odstranění tumoru, d) vyplnění	54
Obr. 41 - Změna počtu buněk, režim p4	55
Obr. 42 - Závislost r a p buněk na vzdálenosti od zdroje živin, režim p4	55
Obr. 43 - Růst buněk na pevném povrchu: iterace 2 000 (a), 6 000 (b) a 8 000 (c).....	56
Obr. 44 - Změna počtu buněk, růst na pevné podložce	56
Obr. 45 - Závislost r a p buněk na vzdálenosti od zdroje živin, růst na rovině.....	57
Obr. 46 - Iterace 4 000 a 8 000 pro model ideální (a, b) a pro cévu (c, d).....	57
Obr. 47 - Změna počtu buněk, růst tkáně s ideálním modelem.....	58
Obr. 48 - Změna počtu buněk, růst tkáně s modelem cévy	58
Obr. 49 - Závislost r a p na vzdálenosti pro model ideální (nahore) a pro cévu (dole)	59
Obr. 50 - Výsledek deseti simulací kolonie buněk HeLa	60
Obr. 51 - Průměrný vývoj počtu buněk ve všech provedených simulacích.....	61
Obr. 52 - Srovnání rychlosti růstu buněk HeLa, převzato z [69] (vlevo) a [80]	62

ÚVOD

Cílem této diplomové práce je vytvoření modelu buněčné kolonie, který by věrně kopíroval chování různých lidských buněk. Počítačové modely živých buněk, jejich intracelulárních procesů i vzájemných interakcí se v systémové biologii často využívají nejen k bližšímu pochopení těchto dějů, ale především pro výzkum nových léčiv a léčebných metod. Není tak překvapením, že častým předmětem modelů jsou tumory, které se od zdravých buněk liší narušenou regulací buněčného cyklu.

Obsahem teoretické části práce je popis fází buněčného cyklu lidských buněk včetně principů regulace pomocí cyklinů a kináz. Dále jsou popsány důležité signální dráhy, které regulují buněčnou proliferaci, velikost a počet buněk a procesy, které rozhodují o životě a smrti každé buňky. V dalších kapitolách jsou popsány způsoby, kterými se popsané intracelulární procesy simulují na počítačích. Jsou vysvětleny rozdíly mezi přístupy bottom-up a top-down a různými metodami kvalitativními a kvantitativními.

Praktickou část práce tvoří popis a realizace navrženého modelu, který je založen na řízení buněčného cyklu s prvky signálních drah pro regulaci metabolismu a velikosti buněk. Model je implementován do nástroje vytvořeného v jazyce C++, který pro vizualizaci trojrozměrné simulované kolonie využívá OpenGL.

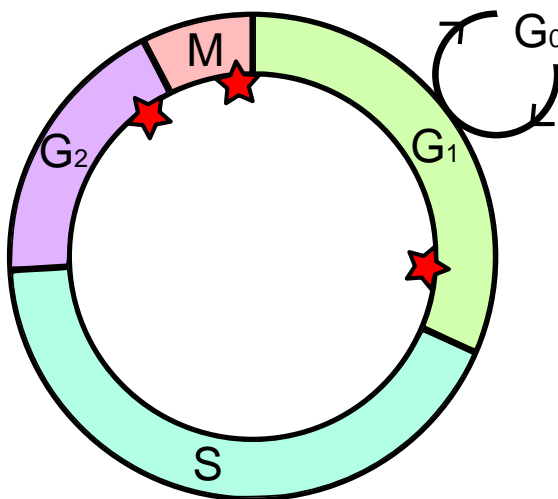
Model je důkladně otestován simulacemi různých buněčných procesů, mezi kterými nechybí růst zdravých i nádorových buněk, mutace buňky ve zdravé tkáni za vzniku tumoru, simulace buněčných kultur na Petriho misce, tvorba dutých orgánů v embryogenezi a oprava poškození hojením. Model je nakonec použit pro simulaci růstu buněk linie HeLa, která se vyznačuje nesmrtelností a rychlou proliferací.

1 ŘÍZENÍ BUNĚČNÉHO CYKLU

1.1. Fáze buněčného cyklu

Základním předpokladem zachování a rozšíření genetické informace i růstu mnohobuněčných organismů je schopnost buněk se dělit. Z jediné mateřské buňky tak po několika hodinách po aktivaci mitogenem vzniknou dvě, v ideálním případě identické, dceřiné buňky [1].

Buněčný cyklus je možné podle pozorovatelných změn rozdělit na interfázi a mitózu a podle intracelulárně probíhajících dějů na 5 různých na sebe navazujících fází – G_1 , S, G_2 , M a klidovou fází G_0 (Obr. 1). Samotná mitóza (fáze M) se navíc podle viditelnosti a polohy chromozomů dělí na profázi, metafázi, anafázi a telofázi, po které je dokončena cytokineze a buňka dokončuje dělení. Doba trvání a samotný průběh těchto fází jsou závislé na koncentracích proteinů cyklinů a cyklin-dependentních kináz (CDK), které dohromady tvoří cyklin-CDK komplexy. Spolu s inhibitory a dalšími faktory tyto komplexy fungují jako regulátory transkripce konkrétních úseků na DNA, které kódují proteiny důležité pro další fázi cyklu [1]. Je tak zajištěna návaznost a periodicita důležitých buněčných dějů, např. zahájení replikace jaderné DNA nebo tvorby mitotického aparátu.



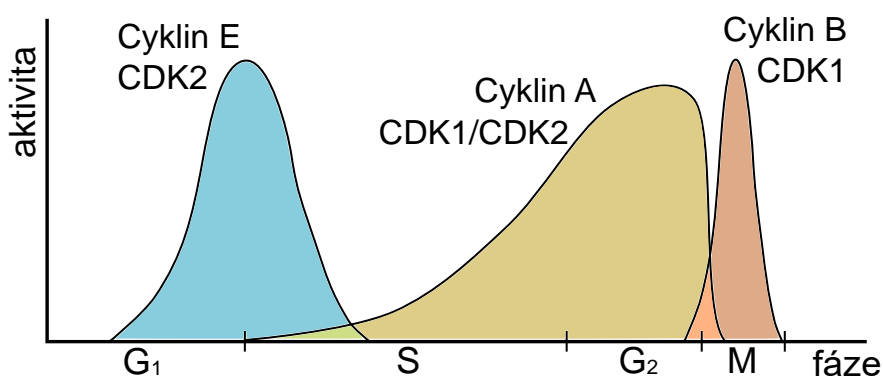
Obr. 1 - Fáze buněčného cyklu s vyznačenými kontrolními body

Různé fáze buněčného cyklu jsou závislé na aktivitě různých cyklin-CDK komplexů. V rané fázi G_1 jsou to cyklin D s CDK4 a CDK6, které po vzájemném navázání fosforylují protein retinoblastom (pRb), čímž se uvolní transkripční faktor E2F, nutný pro expresi dalších proteinů, mimo jiné také cyklinu E a cyklinu A [2].

Právě cyklin E spolu s CDK2 umožňuje v pozdní fázi G_1 přechod do fáze S, která je ovlivněna komplexem cyklin A + CDK1 a CDK2. Tento komplex je důležitý pro správnou replikaci DNA a zároveň fosforylací replikačních mechanismů zamezuje vytvoření více než jedné její kopie [3]. Ve fázi G_2 je cyklin A nahrazen cyklinem B, který se naváže na CDK1. Oba tyto komplexy jsou nezbytné pro správné spuštění, průběh a ukončení mitózy [2].

Aktivita zmíněných cyklin-CDK komplexů se v průběhu buněčného cyklu mění a jak je vidět na Obr. 2, z velké části se časově překrývá. Je tak zřejmé, že buněčný cyklus neprobíhá v přesně časově definovatelných po sobě jdoucích krocích, ale je to souhra souběžně probíhajících a vzájemně se ovlivňujících dějů.

Cykliny, CDK a jejich inhibitory jsou součástí regulačních sítí – signálních drah regulujících buněčný cyklus, obsahujících mnoho komplexních interakcí [5]. Díky těmto sítím může buňka efektivně reagovat nejen na vlastní intracelulární stav, ale také např. na změny koncentrací růstových faktorů ve svém okolí. Právě odpovídající reakce na vnější podněty jsou důležité pro správnou funkci vyšších úrovní – tkání, orgánů a celých organismů. Pokud tedy v regulačním mechanismu ovlivňujícím průběh dělení jediné buňky nastane mutace, jenž způsobí nekontrolovatelnou proliferaci této buňky, může být konečným důsledkem až úmrtí postiženého organismu. V průběhu evoluce se však vytvořily kontrolní mechanismy, které mají za úkol při zjištění nedokončení replikace DNA nebo jejím poškození buněčný cyklus zastavit, nebo alespoň zpomalit tak, aby měly opravné procesy čas vzniklý problém napravit [6].



Obr. 2 - Aktivita cyklin-CDK komplexů v buněčném cyklu, upraveno z [4]

1.2. Kontrolní body

Kontrolní body jsou nedílnou součástí buněčného cyklu a zajišťují návaznost a bezchybné provedení jednotlivých dějů [6]. Podobně jako regulace buněčného cyklu jsou součástí rozsáhlých signálních drah buňky a jejich aktivace musí být vyvolána vnějším podnětem. Spouštěčem drah kontrolních bodů může být např. dvojitý zlom DNA způsobený ionizujícím zářením nebo toxiny. V takovém případě dojde k aktivaci ataxia telangiectasia mutované (ATM) protein kinázy, která fosforylací nepřímo ovlivňuje mnoho procesů, jejichž výsledkem může být oprava DNA nebo i apoptóza – buněčná smrt [7].

V buněčném cyklu jsou tři hlavní kontrolní body (viz Obr. 1). Prvním je G_1/S , označovaný také jako restrikční bod, který bez navázání mitogenu nebo při zjištění poškození DNA pomocí proteinu p53 zastaví další pokračování cyklu, dokud nejsou pro dělení vhodné podmínky nebo není chyba opravena [6]. Po překročení tohoto bodu začíná S fáze a replikace DNA. Druhým kontrolním bodem je přechod mezi fázemi G_2/M , při kterém je buněčný cyklus pozastaven, pokud ještě není dokončena replikace DNA nebo je zjištěno její poškození [6]. Při nenapravitelném poškození je buňka jako v předchozím případě směřována k apoptóze, aby nebyla dál šířena narušená genetická informace. Poslední kontrolní bod je při samotné mitóze mezi metafází a anafází. Pokud v tuto chvíli nejsou všechny chromozomy připevněny k mitotickému vřeténku, je kinetochorami nepřímo fosforylován anafází podporující komplex/cyklozom (APC/C) a cyklus je zastaven [8].

Reakcí buňky na neopravitelné poškození DNA je přechod do senescentního stavu s expresí tumor-supresoru p16 [9], nebo syntéza tumor-supresorového genu p53 s následnou expresí proteinu p53. Důležitost tohoto proteinu dosvědčuje fakt, že delece nebo mutace jeho kódujícího genu je nalezena ve více než polovině lidských tumorů [10]. Protein p53 plní funkci transkripčního faktoru a exprimuje velké množství genů, které inhibují další proliferaci buňky. Důležitým cílem p53 je protein $p21^{WAF1/Cip1}$, který je inhibítozem komplexu CDK2 + Cyklin E kinázy účastnícího se buněčného cyklu [11]. Dalšími důležitými CDK inhibitory (CDI) jsou p27 a p57, které spolu s p21 patří do skupiny Cip/Kip inhibitorů. Protein $p27^{kip1}$ má nejvyšší koncentraci v klidové fázi G_0 a na začátku G_1 velmi rychle v důsledku ubikvitinace klesá [12]. Je tak nezbytný pro samotné spuštění buněčného cyklu. Protein p57 je exprimován v přechodech G_1/S a G_2/M a reguluje buněčnou proliferaci a diferenciaci. Tyto inhibitory skupiny Cip/Kip jsou obecně považovány za tumor-supresory, ale za určitých podmínek mohou mít nežádoucí onkogenní účinek [13].

2 SIGNÁLNÍ DRÁHY

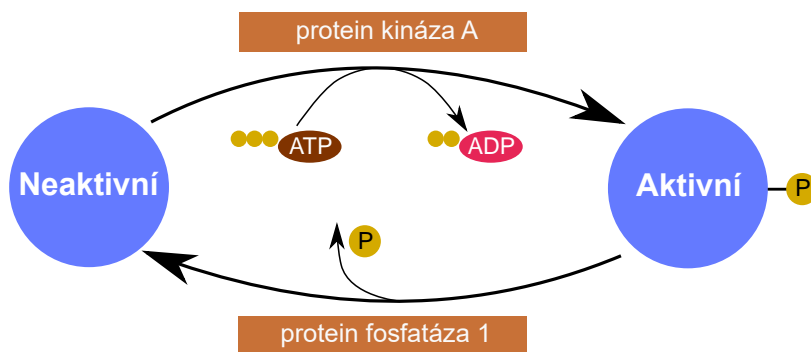
Nové poznatky v oblasti biologie, a hlavně snaha o pochopení komplexních procesů dějících se v živých organismech, daly vzniknout relativně novému vědnímu oboru – systémové biologii, která má za cíl napodobit biologické systémy *in silico*. Za použití biochemie a matematických výpočtů je tak možné s různou mírou abstrakce a s různým časovým měřítkem modelovat interakce od úrovně regulace transkripce genů přes signální a metabolické dráhy až po celé buňky. Signálními drahami se nazývají interakce mezi proteiny, které jsou způsobeny extracelulárním nebo intracelulárním podnětem. Lze rozlišovat např. dráhy regulující buněčný cyklus, dráhy reagující na hormonální podnět či membránové poškození a mnohé další typy drah citlivé pouze na konkrétní látky [14].

Modelováním *in silico* lze velmi rychle a bez nutnosti použít živé organismy zjistit, jak bude organismus reagovat na extrémní podmínky (vysoká teplota, chemické podráždění, nedostatek živin apod.) [15]. Je však také možné sledovat odezvu na experimentální léky a tím je dále vylepšovat a upravovat jejich složení pro co nejvyšší účinnost [16]. K získání takto dokonalých modelů, které odpovídají reálným organickým systémům, je však potřeba velké množství experimentálně získaných dat [15]. Pro identifikaci signálních drah i celých regulačních sítí se využívají dva různé přístupy – tzv. Bottom-up a Top-down. Jak už z názvu vyplývá, Bottom-up přístup spoléhá na znalost základních vlastností a interakcí proteinů v buňce, ze kterých se pak skládají rozsáhlejší modely. Je tedy vhodný, pokud je známa většina genů a účel jejich produktů v regulační síti. Po doplnění chybějících biochemických konstant probíhajících reakcí a experimentálnímu ověření je tak ve výsledku možné provádět vysoce přesné simulace. Naopak u Top-down přístupu se využívají data získaná z DNA microarray, rentgenové krystalografie, hmotnostní spektrometrie a dalších podobných měřících technik. Velké množství dat o aktivitě genů je následně počítačově zpracováno a je odvozena jejich závislost na stavu buňky. Nevýhodou je vysoká výpočetní náročnost automatické rekonstrukce signálních drah. Navíc je výsledná síť pouze odhadem a nemusí přesně odpovídat biologickému systému. Proto se většinou využívá kombinace obou uvedených metod – změřené biologické parametry jsou doplněny do počítačového modelu a ten je upraven tak, aby odpovídal experimentálním měřením [14].

2.1. Signální dráhy ovlivňující buněčnou proliferaci

Velká část signálních drah buňky začíná stimulací v membráně umístěných receptorů. Tyto receptory pak pomocí G-proteinů postupně stimulují intracelulární enzymy, až je nakonec přes další reakce přenášená informace přivedena do jádra, kde je transkripčními faktory regulována genetická exprese [6]. Změna koncentrace nebo samotná přítomnost takto nově vytvořených proteinů pak vede k aktivaci dalších signálních drah, např. pro zahájení buněčného dělení, zahájení apoptózy atd. [5].

Přenos informace do intracelulárního prostředí probíhá mechanickým drážděním receptorů na membráně nebo navázáním chemických signálních látek. V případě hormonální signalizace jsou hormony na receptorech v buněčné membráně zachyceny a do cytoplazmy je uvolněn tzv. druhý posel. Tím může být např. cyklický adenosin monofosfát (cAMP) důležitý v metabolismu glykogenu [6] nebo třeba ionty Ca^{2+} , které zvýšením koncentrace způsobí kontrakci svalových buněk a degradaci uloženého glykogenu na snadno zpracovatelnou glukózu. V různých tkáních pak může být odezva na přítomnost druhého posla odlišná – v případě cAMP výsledný efekt závisí na typu přítomných cAMP-dependentních protein kináz (cAPK) [17]. cAMP také může být jako druhý posel buď přímo aktivním činitelem, a tedy posledním prvkem konkrétní signální dráhy, nebo může být pouze prostředníkem a dále ovlivňovat protein kinázu A (PKA), která dokáže při dodání energie z ATP fosforylovat proteiny a tím je aktivovat (Obr. 3).



Obr. 3 - Aktivace a deaktivace fosforylací a defosforylací, upraveno z [6]

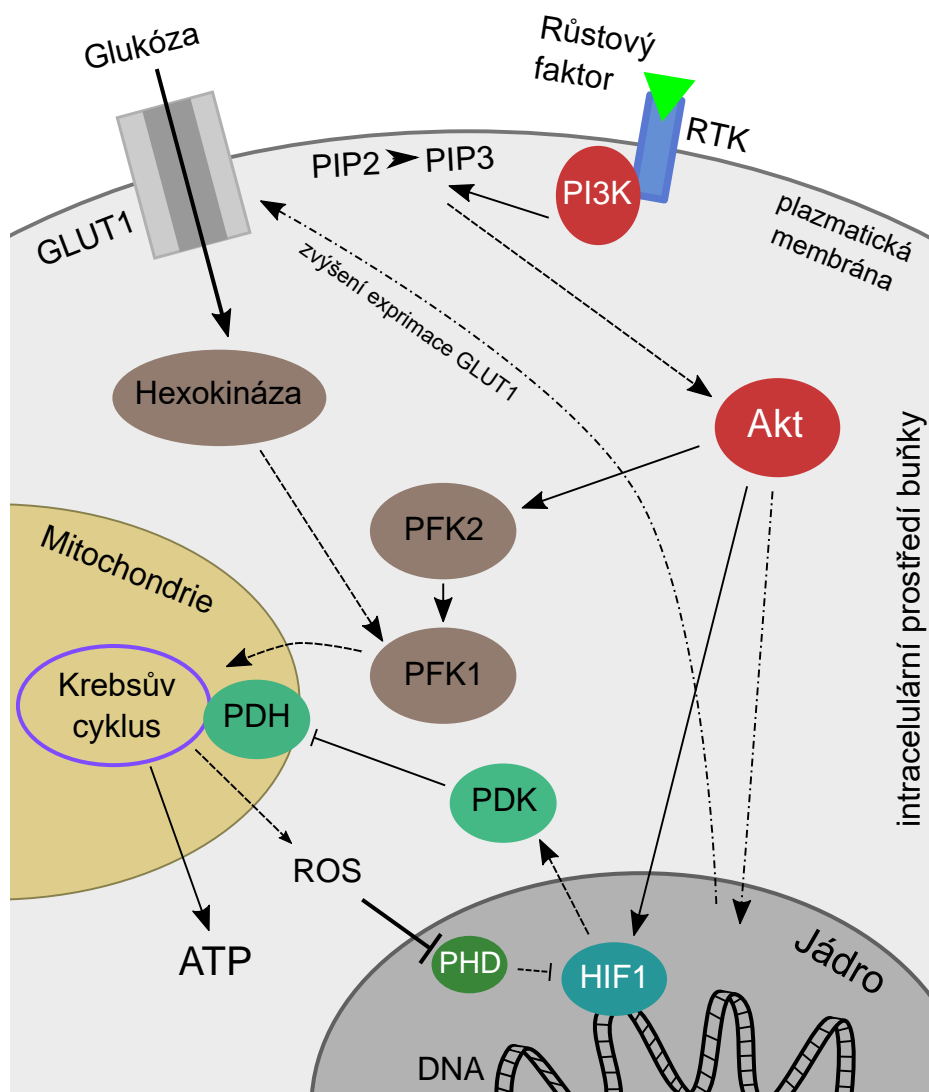
Opačným procesem je pak defosforylace protein fosfatázou 1 (PP1) [6]. Další významný druhý posel fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát (PIP_3) je vytvořen fosforylací fosfatidylinositol 4,5-bifosfátu (PIP_2), což je fosfolipid lokalizovaný v plazmatické membráně. Cílem PIP_3 je protein-serin/threonin kináza Akt (na Obr. 4), která se po fosforylaci a aktivaci dalšími protein kinázami spojí s vnitřní stěnou plazmatické membrány. Odtud fosforyluje další proteiny, které jsou přímo zodpovědné za regulaci buněčné proliferace, transkripčních faktorů, metabolismu a syntézy proteinů [6].

Buněčný metabolismus

Do buněčného cyklu vstupují buňky mnohobuněčných organismů až po navázání extracelulárního růstového faktoru na receptor umístěný v plazmatické membráně [1]. Bez tohoto faktoru setrvávají ve fázi G_0 a nedělí se. Z důvodu vysoké energetické náročnosti celého cyklu je zároveň navázáním růstového faktoru změněn buněčný metabolismus a je navýšen příjem živin a dalších látek důležitých pro buněčnou proliferaci. Metabolismus je však řízen oboustranně a modifikací signálních proteinů se buněčný cyklus bez dostatečného množství živin nespustí [18].

Důležitou signální drahou, která zajišťuje zvýšení příjmu glukózy ve tkáních závislých na inzulinu, je fosfoinositid 3-kinázová (PI3K)/Akt dráha. Její tyrosinkinázové (RTK), cytokinové a G-protein-spřažené (GPCR) receptory jsou umístěné na plazmatické membráně a jsou aktivované růstovými faktory z extracelulárního prostředí. Následnou fosforylací membránových lipidů dochází k aktivaci dalších kináz, mimo jiné protein kinázy Akt, která zajišťuje zvýšenou expresi glukózových kanálů GLUT1 a jejich následný přesun na buněčnou membránu (Obr. 4). Tím je docíleno zvýšené koncentrace glukózy uvnitř buňky. Akt také zvyšuje aktivitu několika důležitých glykolytických enzymů, např. fosfofruktokinázy 1 (PFK1), a nepřímo zvyšuje intercelulární poměr adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu (ADP:ATP), čímž reguluje energetický stav buňky. Výsledkem aktivace Akt je rychlejší biosyntéza makromolekul [19] a i za aerobních podmínek velmi vysoká rychlost glykolýzy a tedy i vysoká sekrece laktátu. Tento jev se po svém objeviteli nazývá Warburgův efekt a je charakteristickým jevem u normálních, rychle se dělících buněk, ale především také u rakovinných buněk bez regulované proliferace [18].

Buněčný metabolismus je regulován také signální dráhou hypoxií indukovaného faktoru 1 (HIF1), která v reakci na hypoxii zajistí expresi genů, jejichž produkty se podílejí na anaerobní glykolýze. Heterodimer HIF1 je tvořen labilní α -podjednotkou a stabilní β -podjednotkou, přičemž α -podjednotka je při normální koncentraci kyslíku hydroxylována prolyl-hydroxylázou (PHD). Při hypoxii k této reakci nedochází, protože je k ní potřeba kyslík – je tak zajištěna stabilita a správná funkce HIF1 faktoru. Ke zvýšení translace HIF1 α mRNA dochází při aktivaci Akt i při zvýšeném příjmu živin a tedy i metabolismu. HIF1 reguluje příjem pyruvátu do Krebsova cyklu mitochondrií pomocí exprese pyruvát dehydrogenázy kinázy (PDK), která fosforylací inaktivuje mitochondriální komplex pyruvát dehydrogenázy (PDH). PDH přitom zajišťuje formování acetyl CoA z pyruvátu a jeho inaktivací je tak metabolismus redukován. Produkty metabolismu (např. reaktivní formy kyslíku – ROS) pak fungují jako inhibitory PHD, čímž je uzavřena zpětnovazební smyčka (Obr. 4) udržující stabilní množství ROS metabolitů pomocí regulace mitochondriálního metabolismu [18].



Obr. 4 - Metabolické dráhy PI3K/Akt a HIF1, zjednodušeno z [18]

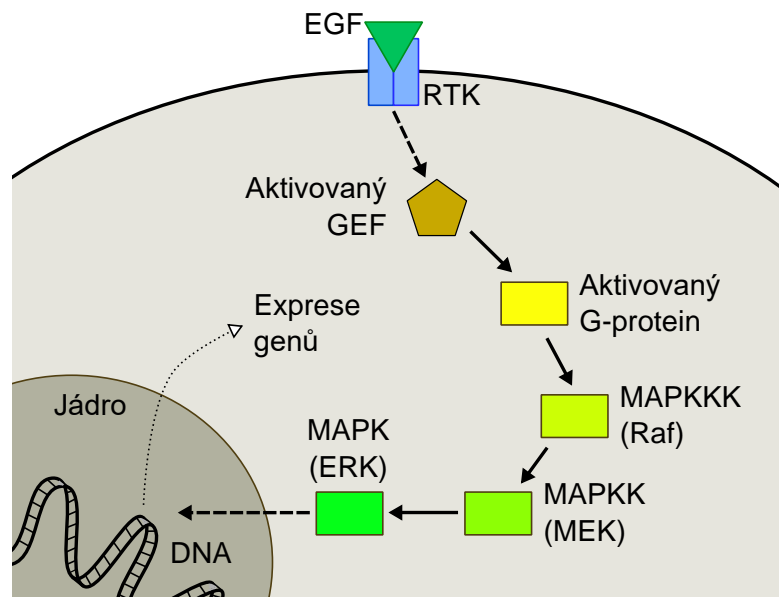
V grafech signálních drah jsou použity orientované hrany se šipkou pro aktivaci a s tupým koncem pro inhibici. Čerchovaná hrana značí expresi genu, přerušovaná pak vynechání některých prvků.

Zpětnovazebné regulace metabolických signálních drah jsou důležité pro stabilitu buněčného metabolismu bez závislosti na přítomnosti růstových faktorů. V případě zvýšeného množství metabolitů nebo nedostatku živin či esenciálních aminokyselin je tak posttranslačními úpravami signalizačních proteinů zajištěno, že v buňce neprobíhají anabolické procesy, které by jinak způsobily její metabolický kolaps [20]. Upravován může být také počet receptorů na povrchu buňky, např. receptorů epidermálního růstového faktoru (EGF) nebo receptorů inzulínu podobného růstového faktoru [18]. V případě nádorových buněk je v důsledku mutací tato regulace počtu receptorů nekontrolovaná, stejně jako není potřeba vnější stimulace růstovým faktorem – buňky jsou z pohledu metabolismu autonomní [19]. Dochází tak k vysokému příjmu živin a rychlému růstu a dělení těchto buněk.

MAPK/ERK signální dráha

Jedněmi z nejdůležitějších regulačních kaskád jsou mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), mající důležitou roli v zahájení a regulaci buněčného cyklu. Podle typu zastoupených kináz lze rozeznat tři rodiny MAPK kaskád – extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK), c-Jun N-terminální kinázy/stresem aktivované protein kinázy (JNK/SAPK) a p38 kinázy. Každá kaskáda se přitom skládá z minimálně tří po sobě aktivovaných enzymů – MAPK kináza kinázy (MAPKKK), MAPK kinázy (MAPKK) a samotné MAPK [21].

Signální dráha MAPK/ERK začíná aktivací v buněčné membráně umístěných receptorů RTK citlivých na růstové faktory (např. EGF) a další tyrosin kinázy. Na RTK se pak z cytoplazmy navážou adaptorové proteiny, které se napojí na guanin-nukleotidové faktory GEF. Následuje aktivace G-proteinu RAS [22] a postupná fosforylace navazujících kináz MAPKKK (konkrétně kinázy c-Raf-1) a MAPKK, mezi které patří MEK1 a MEK2. Tyto protein-kinázy pak fosforylují p44 MAPK (ERK1) a p42 MAPK (ERK2). ERK1 a ERK2 se následně přesouvají do jádra buňky (Obr. 5), kde fungují jako aktivátory transkripčních faktorů pro expresi genů nutných pro buněčný růst, dělení nebo diferenciaci. Podle zastoupených kináz je tato dráha přímo označována jako Raf-MEK-ERK a plní mimo jiné funkci kontrolního bodu G₁/S [21].



Obr. 5 - MAPK/ERK signální dráha, upraveno z [22]

Zatímco signální dráha JNK reguluje apoptózu a přenáší signály pro diferenciaci [23], dráha p38 kinázy je zodpovědná za správnou odpověď buňky na poškození způsobené UV ozářením, teplotním šokem a dalšími vlivy. Takovou odpovědí může být např. zastavení mitózy v kontrolním bodě mezi metafází a anafází nebo apoptóza buňky při jejím neopravitelném poškození. Oproti kaskádě Raf-MEK-ERK signální dráha s p38 inhibuje expresi cyklinu D1, čímž významně přispívá k rovnovážné regulaci buněčného cyklu [21].

Tumorigeneze a MAPK

Jelikož jsou signální dráhy MAPK důležitou součástí řízení mnoha buněčných procesů, jsou v nich vzniklé mutace častým důvodem rozvoje rakovinného onemocnění [24]. Ke vzniku rakoviny je přitom potřeba 6 současných změn v buněčné fyziologii: nezávislost na přítomnosti růstových signálů, potlačení reakce na růst inhibující signály, blokování apoptózy, neomezený replikační potenciál, angiogeneze a invaze do tkání s metastází [25]. Změny v MAPK signalizaci ale mohou způsobit všechna tato nežádoucí chování buněk [24].

Velké množství rakovinných buněk má kvůli nekontrolované nadexpresi RTK, autokrinní produkci aktivačních ligandů nebo mutacemi v RAS nebo Raf neustále aktivovanou dráhu ERK regulující buněčnou proliferaci. Kromě toho může dojít k deregulaci transkripčních faktorů v jádře a buňka si tak může ve velkém množství vytvářet proteiny potřebné k dalšímu zrychlení proliferace [24].

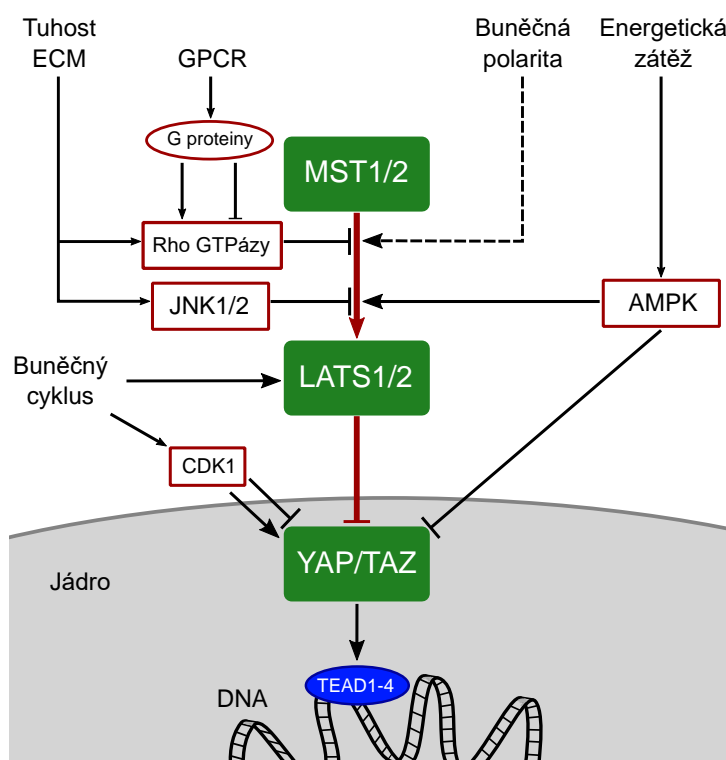
Rakovinné buňky jsou však v důsledku hypoxie, nedostatku prostoru pro další růst, deregulace metabolismu a vnějších vlivů (např. chemoterapie, vystavení ionizujícímu záření při léčbě ozařováním) vystaveny velkému stresu, na který reagují dráhy JNK/SAPK a p38. Díky schopnosti zahájit apoptózu při aktivaci uvedenými vlivy, pokud není tato schopnost mutacemi potlačena, jsou tyto signální dráhy označovány jako tumor-supresorové [24].

Regulace velikosti a počtu buněk

Velikost buněk a jejich počet se po dosažení dospělosti za normálních podmínek nemění, což je důležité pro správnou velikost a funkci orgánu, jehož jsou součástí. Rovnováha v počtu buněk je zajištěna apoptózou poškozených buněk a dělením nových [26]. Jelikož do apoptózy většinou nevstupují zdravé buňky, musí být regulována jejich proliferace.

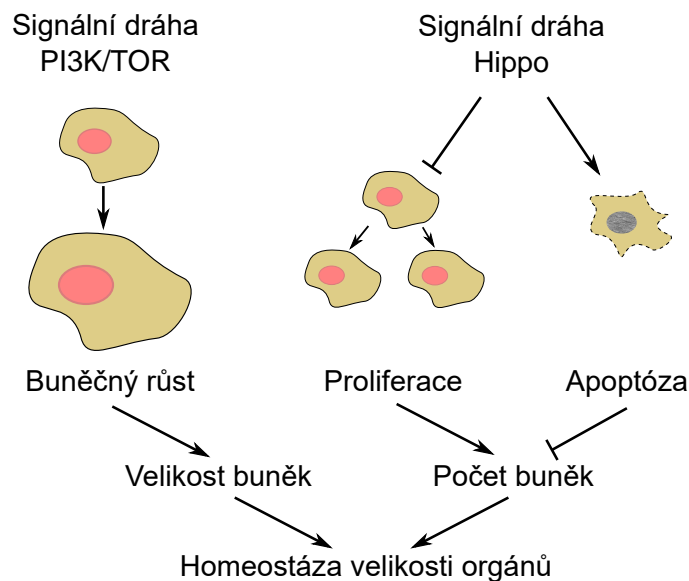
Často zkoumaná, avšak stále ne plně pochopená signální dráha Hippo, původně objevená v octomilce obecné (*Drosophila melanogaster*), je tvořená komplexní sítí kinázových kaskád a transkripčními koaktivátory pro expresi příslušných genů. V závislosti na vzájemném kontaktu buněk, buněčné polaritě, GPCR signalizace a dalších podnětů Hippo ovlivňuje množství buněk a tedy i růst tkání.

Jádrem signální dráhy Hippo (Obr. 6) je kináza MST1/2 fosforylující tumorový supresor LATS1/2, který následně inhibuje aktivitu transkripčních koaktivátorů Yes-asociovaného proteinu (YAP) a koaktivátoru s PDZ-vázaným motivem (TAZ). Pokud jsou YAP a TAZ aktivní, vyvolávají v buněčném jádře prostřednictvím specifických transkripčních faktorů TEAD1-4 expresi genů důležitých pro buněčný cyklus a přežití buňky [27]. V případě jejich inhibice aktivací MST1/2 některým z uvedených podnětů dojde k potlačení schopnosti dalšího dělení. Naopak mutace regulace v signální dráze Hippo, mající za následek např. přílišnou expresi transkripčního koaktivátoru YAP, může způsobit významný nárůst postiženého orgánu [28].



Obr. 6 - Signální dráha Hippo, zjednodušeno z [27]

Dráha Hippo se svou činností doplňuje s dráhou PI3K-TOR, která je důležitým prvkem v regulaci buněčného růstu. TOR je serin-threonin protein kináza, jenž tvoří 2 komplexy – TORC1 a TORC2. Komplex TORC1 stimulací ribozomální biogeneze, translací proteinů a potlačením autofagie ovlivňuje buněčný růst, přičemž sám je regulován růstovými faktory, živinami a množstvím kyslíku [28]. K jeho aktivaci dochází signální drahou PI3K-AKT, která byla popsána v předchozí kapitole Buněčný metabolismus.



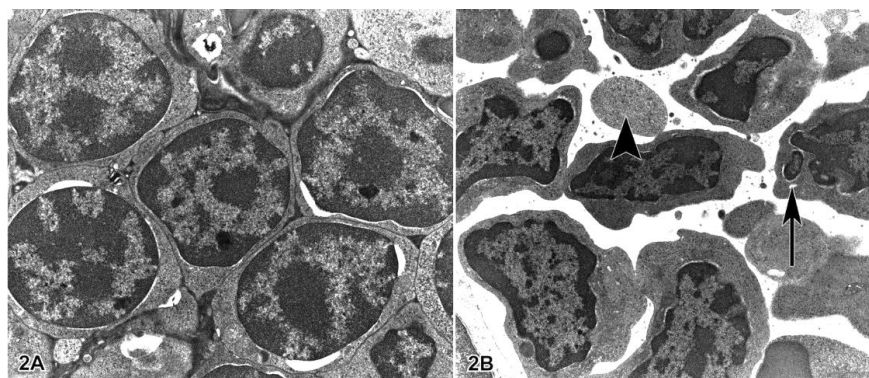
Obr. 7 - Diagram způsobu regulace velikosti orgánů, upraveno z [28]

Kombinací signálních drah Hippo a PI3K-TOR je zajištěna regulace velikosti buněk i jejich dělení. Tyto dva děje spolu přímo souvisí, doplňují se a určují celkovou velikost orgánů a celého organismu (Obr. 7). Narušením regulace těchto signálních drah může dojít až k rozvoji nádorů nebo jiných vážných onemocnění, která jsou kvůli neznalosti přesného umístění mutace v signální dráze jen obtížně léčitelná [27].

Změny tvaru buněk

V průběhu buněčného cyklu se vnější tvar buňky kromě navýšení objemu z důvodu replikace DNA příliš nemění. Přitom však hraje důležitou roli v buněčném růstu a diferenciaci buněk. Tvar buňky se přizpůsobuje extracelulární proteinové síti (ECM), která tvoří bazální membránu a poskytuje oporu pro rostoucí a dělící se buňky. Prostorové uspořádání sítě ECM a velikost její adheze k buňce může ovlivňovat i diferenciaci a proliferaci buňky [29].

K výrazným změnám tvaru dochází při samotné mitóze, kdy se buňka zakulatí a zvětší svůj objem až o 30 %. Zároveň dochází ke ztrátě adheze k okolním buňkám, které se tak snáze posouvají a vytváří místo pro dělící se buňku [30]. Nakonec se buňka po protáhnutí membrány ve směru dělení uprostřed rozdělí na dvě dceřiné, které se tvarem rychle přizpůsobí svému okolí.



Obr. 8 - Buňky zdravé a podstupující apoptózu (vpravo), převzato z [31]

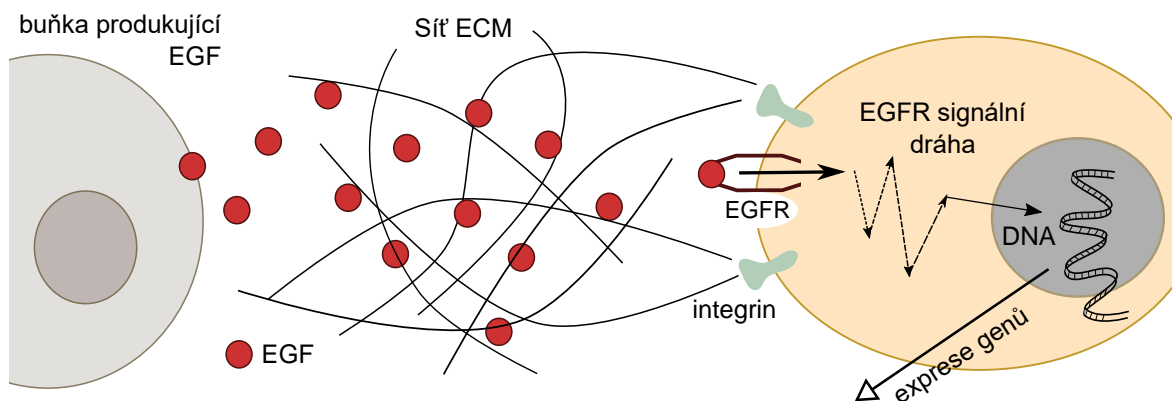
Dalším významným dějem, který způsobuje změnu tvaru buňky, je apoptóza, při níž postupně dochází k jejímu smršťování a v plazmatické membráně se vytvářejí nepravidelné záhyby (Obr. 8). Nakonec je buňka fagocytózou pohlcena okolními buňkami nebo makrofágy, čímž na rozdíl od nekrózy nedochází k zánětlivé reakci [31].

2.2. Intercelulární dynamika buněčných kolonií

Buňky jsou velmi závislé na extracelulárních signálech a podobně jako v případě nutné přítomnosti mitogenů pro zahájení buněčného dělení, i pro buněčný růst je potřeba vnější podnět. Bez růstového faktoru totiž buňka i za přítomnosti dostatečného množství živin neroste a využívá ke svému metabolismu autofagii. Bez dalších extracelulárních podnětů pak dochází k apoptóze [32].

V systémové biologii často modelovanou signální drahou je dráha receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), která zahrnuje kaskádu MAPK a regulaci proteinů řídících buněčný cyklus a kontroluje růst, proliferaci a diferenciaci buněk [33]. Tato dráha je aktivována EGF, jenž je k cílovým receptorům přes extracelulární prostředí přenášen po síti EMC z EGF-produkující buňky (Obr. 9). Laboratorní výroba syntetických biopolymerních gelů s podobnými vlastnostmi jako má ECM umožňuje přesné zacílení růstových faktorů i jiných bioreaktivních molekul na velmi malou oblast ve tkáni. Tyto gely lze výhodně použít pro zrychlení hojení různých zranění a jizev po operacích, ale při nahrazení růstových faktorů látkami napodobujícími infekci je možné cíleně ničit i některé typy tumorů [34].

Také signální dráha apoptózy může být kromě aktivace vnitřní signalizací zahájena navázáním ligandu na membránový receptor [31]. Vnějších signálů je využíváno především v embryonálním vývoji, kdy se odstraňují nepotřebné buňky při formování orgánů a tělesných struktur [36].



Obr. 9 - Schéma přenosu EGF přes extracelulární prostředí, upraveno z [34]

Z extracelulárního prostředí buňka čerpá potřebné živiny a kyslík. Tento proces je zajištěn difuzí z bohatě rozvětvené sítě vlásečnic do tkáňového moku a zároveň jsou takto přes lymfatický systém odváděny produkty buněčného metabolismu [37]. Bez dostatečného cévního větvení by docházelo k apoptóze či nekróze – ať už z nedostatku živin, nebo vysoké toxicity prostředí. Proto buňky s rychlým růstem a proliferací (např. v nádoru) uvolňují vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) podporující angiogenezi a zvyšující vaskulární permeabilitu. Uvolněný VEGF tak podle nároků buněčného metabolismu způsobuje další větvení nejbližších vlásečnic a zvyšuje zásobení tkáně krví [38].

Intercelulární kontakt

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, pro regulaci velikosti a počtu buněk je velmi důležitý jejich vzájemný intercelulární kontakt. Kromě rychlejšího přesunu iontů, malých signálních molekul a vody přímo přes nexy v dotýkajících se membránách sousedních buněk [39] patří mezi výhody také možnost přenosu membránových proteinů, důležitých např. v odpovědi imunitního systému na patogeny [40].

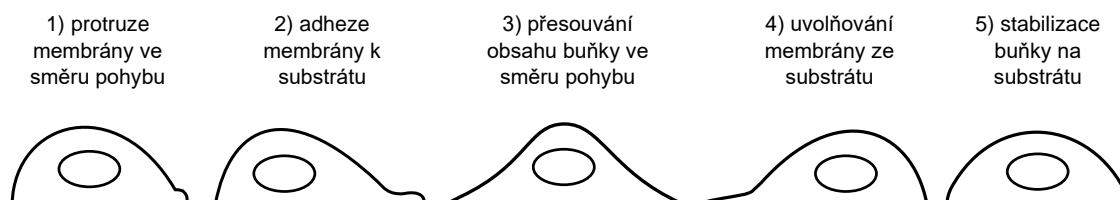
Samotné buňky nejsou ve tkáních náhodně rozmístěné, ale tvoří struktury v závislosti na typu tkáně. Vzájemná adheze je zajištěna navázáním několika typů adhezních receptorů buněčných membrán (např. integrinů, imunoglobulinů a dalších) na ECM tvořené kolagenem a různými velkými glykoproteiny tvořícími vlákna. Receptory v membránách jsou v intracelulárním prostředí navázány na cytoskelet, čímž udržují tvar buňky a zároveň přenášejí signály pro regulaci adheze. Touto regulací je docíleno různého tvaru výsledné sítě propojených buněk, které tvoří např. cévy a výstelky orgánů. Velmi důležitá je i orientace upevnění buněk k ECM, která rozhoduje o správném směru růstu buněčných struktur epitelu v plicích sklípcích nebo např. v tubulech ledvin [41].

Mutace v genech, které kódují proteiny tvořící spojení buněčné membrány a ECM, způsobují vážná onemocnění, mezi která patří např. svalová dystrofie. Svalovým buňkám v takovém případě chybí protein dystrofín, který ve zdravé tkáni upevňuje buňku k bazální membráně. Dochází tak k degradaci svalů, které nejsou schopny snést vysoké zatížení způsobené kontrakcemi svalových vláken [41].

Buněčný pohyb

Adhezi buňky využívají nejen k fixaci k okolním buňkám a strukturám, ale i k pohybu, jenž je však za normálních podmínek ve většině buněk potlačen [42]. K aktivaci této schopnosti dochází např. při regeneraci, imunitní odpovědi na patogeny nebo při rakovinné metastázi. Schopnost buněk se pohybovat je přitom spolu s jejich proliferací a růstem důležitá i pro angiogenezi a morfogenezi, při které dochází k vytváření orgánů a tělesných struktur [43].

Pohyb buňkám umožňuje souhra aktinového cytoskeletu, plazmatické membrány a adhezních receptorů na membráně, přičemž ve směru pohybu buňky, který je dán gradientem chemických signálů i tuhostí substrátu [44], dochází postupně pomocí polymerizace aktinových filament k protruzi membrány a její následné adhezi k substrátu. Na opačné straně buňky pak dochází ke snížení adheze a uvolnění od okolních struktur (Obr. 10). Tímto způsobem se buňka postupně po krocích dlouhých 5-50 μm posouvá vpřed [42].

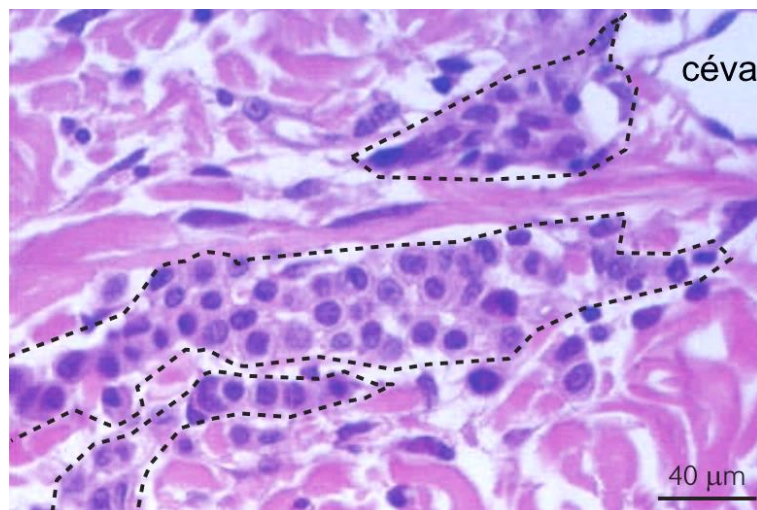


Obr. 10 - Pohyb buňky po substrátu (pevné podložce)

Rozlišovanými formami pohybu buněk jsou chemotaxe, durotaxe a haptotaxe, přičemž chemotaxí je myšlen pohyb do oblastí s vyšším zastoupením rozpuštěných látek (např. živin či růstových faktorů) a durotaxe označuje pohyb do míst s vyšší tuhostí substrátu, tedy sítě ECM. Haptotaxe se také řídí okolním prostředím – adhezí k okolním buňkám a na ECM navázanými látkami [44].

Buňky se mohou popsanými způsoby pohybovat samostatně nebo ve skupinách. Migrace většího počtu buněk je charakteristickým jevem v embryogenezi, kdy se vytváří různé typy tkání a začínají se formovat první orgány, ale k tomuto jevu dochází i v případě tumorů při metastázi, tedy invazi rakovinných buněk do okolní tkáně (Obr. 11). Buňky jsou v takovém případě pevně spojeny adhezí a, aby byla zajištěna koordinace jejich pohybu přes ECM, sdílí polaritu i cytoskeletální dynamiku kontrolující jejich vlastní pohyb. Pohyb celé skupiny

může být řízen několika prvními buňkami podle gradientu koncentrací látek (např. faktorem SDF1, růstovými faktory FGF, TGF β apod.), několika posledními buňkami, které posouvají buňky před sebou, nebo je pohyb zcela náhodný. O tom, který ze způsobů buňky využijí, rozhoduje genetická výbava v kombinaci s adaptací na okolní prostředí [45].



Obr. 11 - Vyznačené skupiny buněk melanomu pohybující se k cévě, převzato z [45]

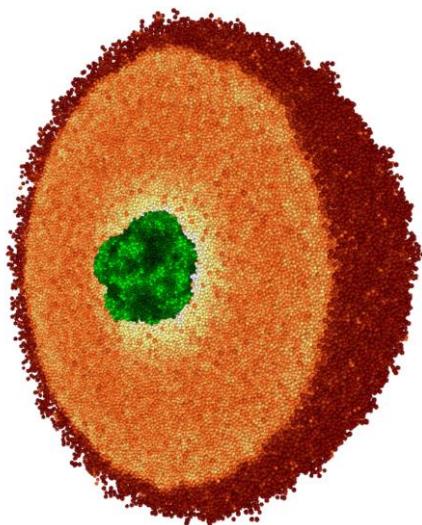
Adaptace a rychlá mutace rakovinných buněk jsou jedním z největších problémů léčby nádorových onemocnění. Pokud nejsou chemoterapií zničeny veškeré buňky tumoru, mohou si v některých případech vyvinout rezistenci proti lékům. Tyto odolné buňky se pak díky schopnosti metastáze v tumoru rozšiřují a nahrazují zbylé, méně odolné buňky. Nové modely růstu tumorů tak naznačují, že potlačení jejich malignity a rychlosti růstu by mělo být možné pomocí omezení možnosti buněčného pohybu [46].

3 TECHNIKY MODELOVÁNÍ BUNĚČNÝCH KOLONIÍ

Znalost vnitrobuněčných mechanismů zpracování extracelulárních signálů a odpovídajících odezev na ně nám dává možnost takto sestavené signální dráhy převést do počítačově zpracovatelné formy a vytvářet tak modely buněk a tkání *in silico*. Takto vytvořené modely jsou použitelné nejen pro simulaci reakcí buněk na různé podněty a simulaci růstu tumorů (Obr. 12), ale lze je využít i k predikci dosud neobjevených buněčných procesů [48].

Modelování lze rozdělit podle použité techniky výpočtů na kvantitativní a kvalitativní, deterministické a stochastické, diskrétní a kontinuální a na metody popisující procesy v prostoru [49]. Zatímco kvantitativní modely využívají přesných výpočtů hodnot koncentrací enzymů za pomoci obyčejných diferenciálních ODE rovnic, kvalitativní modely si vystačí se vzájemnými vztahy mezi jednotlivými procesy a je možné je zjednodušit až na logické sítě. Příkladem může být právě řízení buněčného cyklu, ve kterém záleží hlavně na posloupnosti dějů [50].

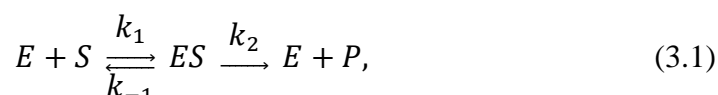
Modelování komplexních signálních drah vyžaduje výpočetní algoritmy, které zvládnou efektivně zpracovat obrovské množství vzájemných interakcí, a přitom jim nedělají problém časová měřítka v rozsahu od méně než jednotek sekund až po měsíce a roky, v závislosti na modelovaném ději. Často se proto používají kombinace různých metod pro různé biologické úrovně [51]. Příkladem takového modelu, kombinujícího více metod výpočtů, je model růstu tumoru popsáný Jiangem a spoluautory [52], který využívá diskrétní model Monte Carlo simulující buněčný růst, proliferaci, smrt i intercelulární adhezi. Logická Boolean regulační síť pak reguluje expresi proteinů spolu s kontrolními body cyklu a ODE rovnice obstarávají extracelulární mechaniku – difuzi živin a metabolitů, koncentrace růstových faktorů a inhibitorů atd.



Obr. 12 - 3D model tumoru rostoucího ve zdravé tkáni, převzato z [47]

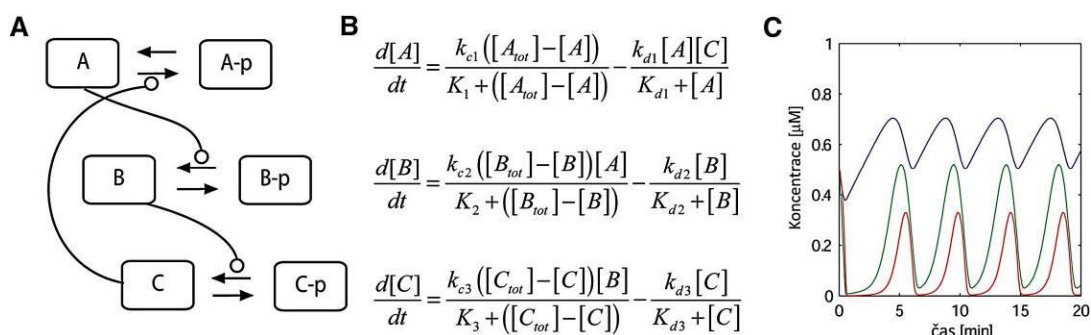
3.1. Kvantitativní metody

Kvantitativní (mechanistické) modely jsou vhodné pro popis časové dynamiky signálních drah [48]. Využívají k tomu ODE kinetických rovnic (v případě modelování v prostoru parciálních diferenciálních rovnic PDE [53]) odvozených z rovnice Michaelis-Menten, která je v biochemii používána pro sledování průběhu enzymatických reakcí. Tato rovnice předpokládá vznik komplexu enzym-substrát za přítomnosti obou složek a následné vytvoření produktu reakce podle kinetické rovnice



kde E je enzym, S je substrát, ES je komplex enzym-substrát a P je produkt enzymatické reakce. Rychlostní konstanty k vyjadřují rychlost reakcí [54].

Pro výpočet těchto rovnic je potřebná znalost všech chemických transformací a počátečních koncentrací všech zastoupených molekul. Výsledkem jsou pak časové průběhy koncentrací jednotlivých zastoupených složek reakce (Obr. 13c).



Obr. 13 - Příklad modelu (A), příslušných ODE (B) a koncentrací (C), převzato z [53]

Problémem tohoto přístupu je nedostatek kvantitativních dat o probíhající kinetice a obrovské množství možných kombinací reakcí, vznikající v důsledku tvorby multiproteinových komplexů, které se účastní více dějů [48]. Řešením je automatické přidání konkrétních složek a jejich reakcí jen když jsou v probíhající reakci potřeba [55], nebo použití doménově orientovaného přístupu, který zjednodušením multiproteinových komplexů a využitím kvalitativních znalostí o probíhajících interakcích výrazně snižuje počet možných kombinací a tím i výpočetní náročnost [56].

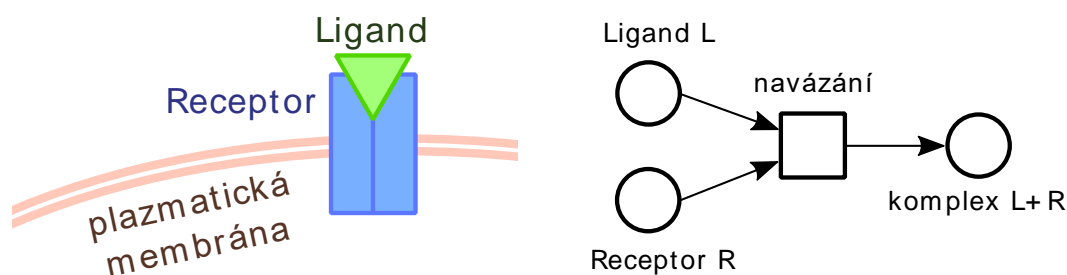
3.2. Kvalitativní metody

Díky tomu, že nevyžadují kinetické parametry a umožňují tak jednodušší výpočty, jsou kvalitativní metody vhodné pro modelování rozsáhlých sítí velkého počtu prvků. Vycházejí z grafů signálních drah, ve kterých jsou biologické prvky označeny jako uzly, přičemž orientované hrany mezi nimi označují vzájemné interakce. V nejjednodušším možném případě lze považovat uzel za aktivní nebo neaktivní, čímž se v závislosti na typu hrany aktivuje nebo inhibuje cílový uzel [57]. Např. Boolean logické sítě pracují právě jen s hodnotami 0 (neaktivní) a 1 (aktivní) [58], ale v některých modelech se používají i proměnné s více možnými hodnotami nebo přímo spojitými fuzzy hodnotami [57].

Petriho síť

Přestože byly Petriho síť (PS) v minulosti používány převážně k analýze komunikačních sítí, výpočetních systémů apod., staly se díky možnosti kombinovat kvantitativní a kvalitativní techniky velmi oblíbenými i pro modelování biologických sítí [59][60]. Základem PS je graf se dvěma typy uzlů – místy a přechody, v grafech zakreslovanými jako kružnice a čtverce (Obr. 14).

Zatímco místa vyjadřují prvky systému (např. druhé posly, proteiny nebo třeba část buňky – membránu, DNA atd. [61]), přechody určují podmínky, jejichž splnění způsobí změnu stavu dalších míst. Tyto uzly jsou propojeny orientovanými váhovanými hranami, vyjadřujícími vzájemné vztahy a interakce. Dynamika systému je reprezentována značkami (tokeny), které se postupně přemísťují podle toho, kolik těchto značek je na vstupním uzlu a jakou váhu má přechodová hrana. Stav modelovaného systému je zapisován do matic bez závislosti na reálném čase potřebném k provedení reakcí – jeden časový krok odpovídá provedení všech interakcí v systému [59].



Obr. 14 - Příklad zakreslení navázání ligandu na receptor do PS, upraveno z [61]

Pro modelování biologických sítí se používají různá rozšíření klasických PS, např. barvené PS, které umožňují pracovat s více typy tokenů, stochastické PS beroucí ohled na nepřesnosti vstupních dat a hybridní PS dovolující současné modelování diskrétních a kontinuálních procesů [59]. Kontinuální procesy je možné popisovat také pomocí kontinuálních PS, ve kterých jsou místo celých čísel u tokenů použita čísla reálná a změny jejich velikosti jsou definovány systémem ODE rovnic [61]. Dalším možným rozšířením je hybridní funkční Petriho síť, která má celkem 5 možných hran – diskrétní vstup a výstup, kontinuální vstup a výstup, testovací hrany pro testování podmínek [62]. Tato rozšíření PS umožňují přístupem Top-down vytvářet přesnější kvalitativní modely, ze kterých je možné odvodit parametry pro kvantitativní modely. Nevýhodou PS je však komplikovaná implementace prostoru, např. gradientů v intracelulárním prostředí, a různých časových měřítek pro různě rychle probíhající procesy [59].

Boolean síť

Boolean síť využívají pouze dvou možných binárních stavů (0 a 1) a stejně jako u PS je jejich základem graf interakcí mezi jednotlivými prvky modelovaného systému. Neaktivita či aktivita proteinu i v čase t je dána výsledkem skokové funkce

$$\sigma_i(t+1) = \text{sgn}\left(\sum_{j=1}^{k_{in}(i)} J_{ji}\sigma_j(t) - \theta_i\right), \quad (3.2)$$

kde k_{in} jsou binární vstupy z ostatních proteinů a interakcí a J_{ji} jsou váhy každého z těchto vstupů, přičemž pro aktivaci jsou kladné a pro inhibici záporné. Hodnota prahu θ_i proteinu i je kladná pro aktivační a smíšené interakce, ale v případě regulace pouze inhibičními vstupy je nutné nastavit jeho hodnotu na zápornou hodnotu, aby se provedla aktivace. Výsledek funkce $\text{sgn}(x)$ je pak 1 (aktivní), pokud je $x > 0$ a naopak 0 (neaktivní), pokud je $x \leq 0$ [63].

Výpočet aktivity každého prvku modelu je možné provádět synchronně nebo asynchronně. V prvním případě jsou veškeré výpočty pro všechny proteiny provedeny v jednom iteračním kroku. Takový způsob zpracování je výpočetně nenáročný, ale vede k artefaktům. Naopak asynchronní aktualizace stavů, při které jsou výpočty prováděny postupně, vyžaduje pravidla, která zajistí správné chování v případě souběžných přechodů stavů více prvků. Je však možné použít i kombinaci těchto přístupů, kdy se v závislosti na konkrétních regulačních elementech vybere nejvhodnější metoda výpočtu [64].

ODE modely založené na logických sítích

Přechodným krokem mezi kvalitativními a kvantitativními modely jsou logické ODE modely, umožňující spojitý výpočet v časových i prostorových souřadnicích. Jedním ze způsobů vyjádření logického modelu spojitými veličinami jsou parciální diferenciální rovnice

$$\dot{\bar{x}}_i(t) = F_i(\bar{x}(t)) - \lambda_i \bar{x}_i(t), \quad (3.3)$$

kde \bar{x}_i vyjadřuje koncentraci prvku i v modelu (např. proteinu), λ_i vyjadřuje rychlost degradace a F_i je kombinací skokových funkcí

$$s^+(\bar{x}_j, \theta_j^k) = \begin{cases} 1, & \bar{x}_j > \theta_j^k \\ 0, & \bar{x}_j < \theta_j^k \end{cases} \quad (3.4)$$

a

$$s^-(\bar{x}_j, \theta_j^k) = 1 - s^+(\bar{x}_j, \theta_j^k), \quad (3.5)$$

kde θ_j^k je práh vstupního prvku j , který je nutné překročit k aktivaci cílového proteinu i [57].

Dalším možným přístupem vytvoření spojitého ODE modelu z pozorovaných kvalitativních dat je polynomiální interpolace s více proměnnými

$$\dot{\bar{x}}_i = \frac{1}{\tau_i} (\bar{B}_i(\bar{x}_{i1}, \bar{x}_{i2}, \dots, \bar{x}_{iN_i}) - \bar{x}_i), \quad (3.6)$$

kde \bar{x}_i vyjadřuje koncentraci prvku i , τ_i je doba života prvku x_i , \bar{B}_i je kontinuálním vyjádřením odpovídajícím výsledku skokové funkce v Boolean síti a N je počet všech vstupů, které ovlivňují aktivitu prvku i . Protože však molekulární interakce nejsou reálně skokové, ale odpovídají sigmoidě, bývá \bar{B}_i nahrazována funkcí \bar{B}_i^H s Hillovou funkcí [58].

Přestože jsou ODE modely vytvořené z logických sítí pouze fenomenologické modely, které odpovídají předpokladům o intracelulární mechanice, na rozdíl od Boolean modelů dokáží rozeznat více než dvě různé úrovně koncentrací. Je tak možné je využít i k predikci kvantitativních experimentálních výsledků [58].

3.3. Modelování intercelulární dynamiky

Častým cílem modelů buněčných kultur je prostorové modelování růstu tumorů ve zdravé tkáni [47][52][65], které pro co největší podobnost s reálnými tkáněmi, a tedy i medicínský přínos, vyžaduje zakomponování intercelulární dynamiky rakovinných i zdravých buněk.

Elasticita a adheze membrány

Plazmatická membrána buněk je pružná a snaží se, podobně jako např. u mýdlových bublin, minimalizovat celkovou styčnou plochu s okolními buňkami. Povrchové napětí membrány buňky je možné zapsat pomocí Potts modelu [66].

Buněčné Potts modely (CPM) popisují buňky za použití energií a elasticity jako objekty bez vnitřní struktury a jsou často používány v různých biologických simulacích, protože umožňují popis mnoha buněčných dějů – diferenciaci, růst, smrt, změny tvaru, pohyb buněk i příjem a sekreci látek [67]. Efektivní energie E v modelu CPM může být definována jako

$$E = E_{adheze} + E_{objem} + E_{pohyb}, \quad (3.7)$$

kde jednotlivé složky vyjadřují energie pro adhezi nebo repulzi membrán sousedních buněk, pro celkový objem buňky a pro pohyb buňky po gradientech chemických látek (chemotaxe) nebo po ECM (haptotaxe). Energie pro adhezi je vyjádřena jako

$$E_{adheze} = \sum_{(i,j,k)(i',j',k') \text{ okolí}} J_{\tau(\sigma)\tau'(\sigma')} \times \left(1 - \delta(\sigma(i,j,k), \sigma'(i',j',k'))\right), \quad (3.8)$$

kde $J_{\tau,\tau'}$ vyjadřuje povrchovou energii stěny buňky se sousední buňkou a $\tau(\sigma)$ je buněčný typ asociovaný s buňkou σ . Funkce $\delta(\sigma, \sigma')$ je nulová, když membrána patří dvěma rozdílným buňkám, a jednotková, pokud patří stejné buňce. Proměnné i, j a k zde vyjadřují prostorové souřadnice.

Energie pro objem buňky se mění v průběhu buněčného cyklu při růstu buňky a je vypočítána pomocí vzorce

$$E_{objem} = \sum_{\text{buňky } \sigma} \lambda_{\sigma}(v(\sigma, \tau) - v_{cil}(\sigma, \tau))^2 + \lambda'_{\sigma}(s(\sigma, \tau) - s_{cil}(\sigma, \tau))^2, \quad (3.9)$$

ve kterém má buňka σ typu τ určený objem $v_{cil}(\sigma, \tau)$, objemovou elasticitu λ_{σ} , určenou plochu povrchu $s_{cil}(\sigma, \tau)$ a membránovou elasticitu λ'_{σ} [67].

Efektivní energie CPM pro pohyb buňky podle chemického gradientu nebo podle extracelulární sítě ECM je vyjádřena vztahem

$$E_{pohyb} = \mu(\sigma)C(\vec{x}), \quad (3.10)$$

kde $\mu(\sigma)$ je chemický potenciál a $C(\vec{x})$ vyjadřuje lokální koncentraci signální molekuly x v extracelulárním prostředí [67].

Dalším možným způsobem modelování intercelulárního membránového kontaktu je použití Hertz modelu, který adhezivní síly aproximuje podle vzdálenosti středů sousedních buněk kulovitého tvaru [47]. Výsledný potenciál $V_{c_i c_j}$ pro buňky c_i a c_j je vypočítán podle vztahu

$$V_{c_i c_j} = (r_{c_i} + r_{c_j} - d_{c_i c_j})^{\frac{5}{2}} \frac{1}{5E_{c_i c_j}} \sqrt{\frac{r_{c_i} r_{c_j}}{r_{c_i} + r_{c_j}}} + A_{c_i c_j}, \quad (3.11)$$

kde r je poloměr buněk, d je vzdálenost obou buněk, E je Youngův modul a A vyjadřuje adhezivní síly podle vztahu

$$A_{c_i c_j} = 25 \cdot \rho_m D_{c_i c_j} k_B T, \quad (3.12)$$

kde T je teplota, k_B je Boltzmannova konstanta, D je plocha kontaktu mezi oběma buňkami a ρ_m vyjadřuje hustotu plošné adheze, která je pro stejný typ buněk konstantní.

Celková velikost potenciálu V pro buňku c_i je rovna sumě všech potenciálů kontaktů s okolními buňkami c_j . Derivací potenciální funkce V_{c_i} lze jednoduše spočítat vektor pohybu buněk. Oproti předešlému modelu však tento způsob výpočtu pohybu nepočítá s chemotaxí ani haptotaxí [47].

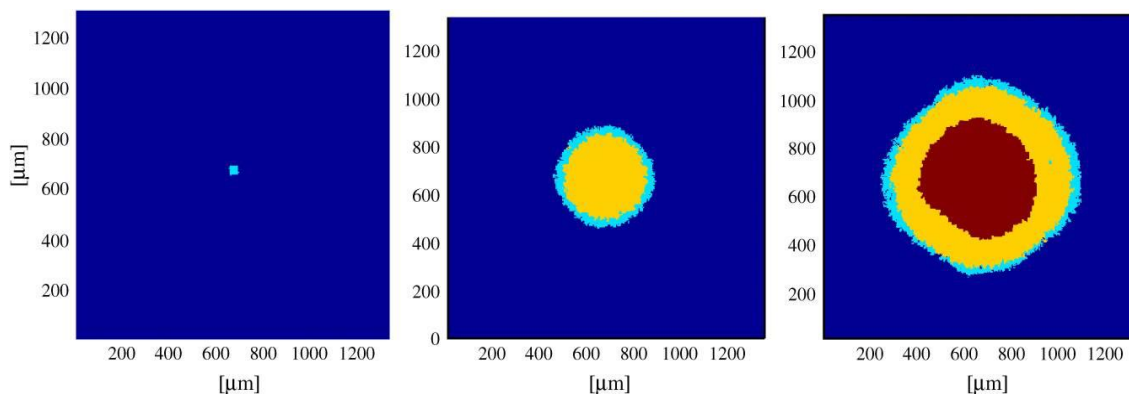
Kromě pohybu jednotlivých buněk, které mohou v případě karcinomů způsobit metastáze ve vzdálenějších oblastech, není neobvyklý ani současný přesun skupin více buněk. Záleží ovšem na typu tkáně i buněk samotných. Pro modelování těchto jevů je nutné, aby použitý algoritmus umožňoval simulaci invazivního chování typického pro rakovinné buňky [65].

3.4. Grafická reprezentace modelů

Pro dobré pochopení problematiky je v některých případech vhodnější zvolit zobrazení grafiky před sice přesnými, ale na první pohled obtížně hodnotitelnými matematickými rovnicemi. V případě systémové biologie a modelování komplexních signálních drah bývá grafika jedinou možností, jak přehledně vyjádřit výstup simulace. Záleží ovšem na typu simulace, která je prováděna, a na informaci, která by měla z výsledného modelu vyplynout.

Při výzkumu signálních drah se u kvantitativních modelů často využívá zobrazení průběhu koncentrací jednotlivých proteinů a chemických látek uvnitř i vně buňky v závislosti na čase (viz Obr. 13c). V těchto grafech jsou dobře rozlišitelná vzájemná ovlivňování jednotlivých složek modelu a při odvozování nových modelů lze tímto způsobem odhalit zatím neznámé komponenty signální dráhy [48].

Pro modelování chování dvou- a vícerozměrných modelů, např. buněčných kolonií a tumorů, je však pouhé zobrazení grafů pro plné pochopení vzájemných interakcí a intercelulární dynamiky nedostatečné. Používají se proto různé interpretace samotných buněk – ve dvourozměrném prostoru v podobě bodů (pixelů) (Obr. 15), kruhů či mnohoúhelníků a ve trojrozměrném zobrazení jsou buňky vzhledem k výpočtům objemu a povrchu nejčastěji zobrazeny jako prosté koule (Obr. 12) nebo krychle [46].



Obr. 15 - Zobrazení dvourozměrného modelu tumoru, převzato z [52]

Vzhledem k malé velikosti buněk (desítky mikrometrů) a nutnosti počítat oblasti tkáně v měřítku alespoň mm^3 , aby měla simulace klinický význam a tumory svou velikostí odpovídaly reálně diagnostikovatelným nádorům, je nutné najednou simulovat vzájemné interakce až několika miliard buněk [46]. Tyto extrémně náročné výpočty je proto nutné provádět na výkonných paralelizovaných systémech a superpočítačích [47].

4 MODEL BUNĚČNÉ KOLONIE

Vytvořený model buněčné kolonie umožňuje simulovat proliferaci zdravých i rakovinných buněk, jejichž chování je řízeno navrženým fenomenologickým modelem založeným na známých principech regulace buněčného cyklu a intercelulární dynamice lidských buněk. Model pro výpočet rychlostí buněčného cyklu a velikostí buněk v kolonii využívá rovnic, které byly odvozeny z logických sítí signálních drah popsanych v kapitole Signální dráhy.

4.1. Vytvoření modelu buněčného cyklu

Základem vytvořeného modelu je řízení buněčného cyklu, které určuje, za jakých podmínek, a zda vůbec, se bude buňka dělit. Mezi možné stavy, kterých může libovolná buňka v simulaci nabývat, patří fáze G_0 , G_1 , buněčný cyklus zahrnující fáze S, G_2 a M a apoptóza, která nastává při nadměrném poškození buňky a po které je buňka ze simulace trvale vymazána. Dobu, po kterou buňka zůstává v těchto fázích, je možné po prvním spuštění programu měnit s tím, že 1 minutě odpovídá 1 provedená iterace výpočtů. Spolu s dalšími změnami parametrů lze tímto způsobem modelovat různé typy buněk, včetně rakovinných.

Fáze G_0

Ve fázi G_0 je modelovaná buňka nečinná a na první pohled nevykazuje žádné známky aktivity. Zachovává si však bazální metabolismus, se kterým souvisí spotřeba živin z blízkého okolí a vytváření metabolitů, které jsou z buňky uvolňovány. Implementována je i regulace velikosti buňky, jenž se přizpůsobuje vypočtenému požadovanému poloměru.

Přechod z fáze G_0 do G_1 je iniciován nadprahovým množstvím živin a růstového faktoru. Tato změna je inhibována množstvím dotyků membrány buňky s okolními buňkami [27] – pokud je tedy buňka uprostřed rychle se dělicí kolonie, je zamezena její schopnost přejít do fáze G_1 a poté případně do buněčného cyklu, čímž dochází k regulaci počtu buněk a výsledné velikosti modelované kolonie.

Pokud jsou obě podmínky splněny, buňka zatím do fáze G_1 nepřechází ale syntetizuje proteiny, které jsou potřebné pro zvýšený metabolismus a přípravu na buněčný cyklus. Tímto je také v modelu zamezeno nežádoucímu kmitání mezi fázemi G_0 a G_1 , které nastává při nestabilních hodnotách růstových faktorů a počtu dotyků, jejichž množství se v průběhu simulace neustále mění. Délka čekání na syntézu je daná uživatelsky nastavitelným časem 180 iterací (180 minut) za předpokladu délky fáze G_1 540 minut [1] a začátku fáze S 720 minut po stimulaci růstovým faktorem [68]. Za nepříznivých podmínek jsou tyto proteiny postupně degradovány a po opakované stimulaci si je buňka musí vytvářet znovu.

Vytvořený model, stejně jako živé buňky, rozlišuje mezi vratnou a nevratnou fází G_0 . O tom, zda bude buňce umožněno vrátit se do buněčného cyklu, rozhoduje množství jejího poškození [9]. Pokud je relativní poškození buňky větší než 25 %, buňka nemůže přejít do G_1 a zůstává v senescentním stavu.

Fáze G_1

V této fázi se buňka rozhoduje, zda vstoupí do buněčného cyklu a rozdělí se, nebo se vrátí zpět do klidové fáze G_0 . V živých buňkách se tento proces nazývá restrikčním bodem a je závislý na množství navázaných růstových faktorů i dostatečném množství živin [18]. Ve vytvořeném modelu trvá fáze G_1 celkem 540 minut (iterací) [1] a poté restrikční bod vyhodnocuje dostatek růstových faktorů a živin, počet dotyků i poškození buňky.

Práh pro výpočet minimálního množství růstových faktorů je v navrženém modelu zvolen jako

$$p = 0,5 - Z$$

$$práh = \begin{cases} 0,1, & p \leq 0,1 \\ p, & p > 0,1 \end{cases} \quad (4.1)$$

kde proměnná Z odpovídá množství živin v okolí buňky a stejně jako všechny modelované koncentrace látek nabývá relativních množství v rozsahu $<0, 1>$. Způsob výpočtu prahu byl zvolen s ohledem na předpoklad, že pokud má buňka k dispozici dostatečné množství živin, je schopna vytváření většího množství RTK receptorů a je tedy větší pravděpodobnost zachycení v extracelulárním prostředí přítomných růstových faktorů. Následná podmínka pak zajišťuje, že se modelované buňky nebudou dělit bez minimálního množství navázaného růstového faktoru. Tato prahová hodnota je nastavena na hodnotu 0,1. Stejně minimum platí i pro živiny. Pokud by množství růstového faktoru, živin nebo kyslíku kleslo pod hodnotu 0,01 (tedy 1 %), buňka umírá [32].

Součástí restrikčního bodu je kontrolní bod buňky, ve kterém je hodnoceno poškození DNA. Výpočet úrovně poškození u má tvar

$$u = rand - dmg_i, \quad (4.2)$$

kde $rand$ je generované náhodné číslo z intervalu $<0, 1>$ a dmg_i je poškození buňky i metabolity a toxiny z okolí. Výsledek je následně srovnán s uživatelsky měnitelným prahem nastaveným na $5 \cdot 10^{-3}$, se kterým jsou v každé generaci buněk označeny k apoptóze přibližně 2 % dělících se buněk kolonie [69]. Buňka je vyhodnocena jako nadměrně poškozená, pokud je u menší než práh. Pokud je buňka nepoškozená, má dostatek růstových faktorů i živin a splňuje nastavený limit počtu dotyků s okolím, nevratně vstupuje do buněčného cyklu.

Buněčný cyklus

Vytvořený model pracuje s buněčným cyklem jako s jediným procesem a sjednocuje fáze S, G₂ a M. Celková doba, kterou buňka v cyklu setrvává, je dána dílčími časy zadanými uživatelem v konfiguračním souboru modelu. Ve standardním nastavení je nastavena doba 600 minut pro fázi S, 270 pro G₂ a 30 minut pro fázi M, tedy délky odpovídající lidským buňkám [1].

V první části cyklu, jehož délka odpovídá součtu výše uvedených časů, buňka postupně zvětšuje svůj objem na dvojnásobek. Živé buňky si tímto způsobem vytvářejí prostor pro nově replikovanou DNA a mitotický aparát a zároveň je tlakem na okolní buňky vytvářen prostor pro nové, dceřiné buňky. Krok růstu je vypočítán podle rovnice

$$krok = \frac{(r_i \cdot \sqrt[3]{2}) - r_i}{t}, \quad (4.3)$$

odvozené z výpočtu objemu koule, kde r je požadovaný poloměr buňky i (viz kapitola regulace velikosti) a t je celková doba trvání buněčného cyklu. V každé iteraci simulace je objem buňky navyšován o hodnotu *krok* až po dosažení konce cyklu.

Po ukončení růstu je provedena poslední kontrola poškození DNA pomocí kontrolního bodu, jehož princip je stejný jako ve fázi G₁ (rovnice 4.2) ale protože jsou v jediném výpočtu zahrnuty dva kontrolní body (Obr. 1), je práh apoptózy dvojnásobný.

Pokud buňka přežije, v dalším kroku dochází k jejímu dělení. Nově vytvořené buňky mají poloviční objem a dědí vlastnosti buňky mateřské – úroveň poškození, rychlost metabolismu, informaci o rakovině aktivitě, poloviční množství případných metabolitů a pro prvotní vstup do algoritmu také délku cyklu, krok růstu a požadovanou velikost. Nové buňky automaticky vstupují do fáze G₁, ve které se v několika následujících iteracích rozhodne, zda bude buňka pokračovat v dělení, nebo jestli vstoupí do klidové fáze G₀. Při dělení je směr prvotního pohybu buněk určen náhodně bez bližší analýzy okolního prostředí – interakce s ostatními buňkami a pohyb v prostoru je zpracováván samostatnou částí modelu, která je popsána v kapitole 4.4.

Apoptóza

Pokud je buňka označena k apoptóze, např. z důvodu vysokého poškození nebo aktivací kontrolního bodu, dojde k jejímu nevratnému vymazání. Před samotným vymazáním však modelovaná buňka, stejně jako buňka živá, snižuje svůj objem a odpoutává se svou membránou od okolních buněk. Objem je, podobně jako v případě růstu, upravován pomocí změny poloměru podle vzorce

$$r_i = r_i - \frac{r_{0i}}{t}, \quad (4.4)$$

kde r je aktuální poloměr buňky i , r_0 je požadovaný poloměr živé (původní) buňky a t je délka probíhající apoptózy nastavená na hodnotu 180 minut [31].

4.2. Model signálních drah

Pro co největší podobnost odezvy modelovaných a živých buněk na vnější podnět byly do modelu implementovány prvky signálních drah. V reálných buňkách tyto dráhy slouží k transformaci a propagaci informace z vnějších receptorů do jádra, ve kterém následně dochází k expresi příslušných proteinů, které způsobí požadovanou reakci na podnět. Často se pro modelování signálních drah využívají komplexní sítě mnoha vzájemně se ovlivňujících objektů, které přesně kopírují reálné enzymy a intracelulární struktury [21][49]. Vzhledem k náročnosti těchto výpočtů a skutečnosti, že účelem signálních drah je zejména vyvolat odpovídající reakci, se tyto modely zjednodušují na logické a méně rozsáhlé sítě interakcí se stejným výsledkem [50]. V případě modelů růstu kolonií buněk a tumorů se signální dráhy často nepoužívají vůbec [47], nebo jen ve velmi zjednodušené formě [52], protože v těchto měřících, časových i prostorových, je jejich přínos k validitě modelu vůči zvýšení výpočetní náročnosti spíše malý.

Navržený model signálních drah kromě množství metabolitů a živin nerozlišuje mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím buňky a aproximuje dříve popsany metabolický model PI3K/Akt a HIF1 (Obr. 4) spolu s regulací velikosti a počtu buněk kombinací drah Hippo a PI3K-TOR (Obr. 7). Touto kombinací bylo docíleno stabilního systému, ve kterém je velikost a počet buněk řízen v závislosti na dostupném množství živin a růstových faktorů a metabolismus jednotlivých buněk je regulován dostupností kyslíku, živin a množstvím produkovaných metabolitů. Rychlost proliferace pak závisí, podobně jako u živých buněk, na množství dostupných látek.

Metabolismus buňky

Rychlost buněčného metabolismu je v navrženém modelu závislá na aktuálním množství růstového faktoru, živin a kyslíku v prostoru buňky. Množství látek a jejich prostorové gradienty jsou zadány parametricky a je možné je měnit před spuštěním simulace.

Stejně jako u živých buněk (Obr. 4) dochází v modelu po nadprahové stimulaci buňky růstovým faktorem k aktivaci protein kinázy Akt. Aktivační funkce je logická a Akt tak nabývá funkčních hodnot $\{0, 1\}$. V dalším kroku je vypočtena schopnost buňky přejít do buněčného cyklu. Pokud je splněna podmínka nadprahového množství růstových faktorů i živin, buňce je umožněno pokračovat nastavením proměnné *prechod_G1* na logickou hodnotu 1. V případě, že je hodnota nulová, si modelovaná buňka zachovává kladné hodnoty metabolismu, ale ten je nižší než při povoleném přechodu. Tímto je simulován vyšší energetický výdej buňky, která se připravuje na dělení.

Následuje výpočet množství prolyl-hydroxylázy PHD, která je závislá na koncentraci kyslíku a je inhibována produkty metabolismu ROS. Množství PHD v modelu odpovídá

$$PHD = \frac{9 \cdot O_2 + (1 - ROS)}{10}, \quad (4.5)$$

kde O_2 je množství kyslíku na pozici buňky a ROS odpovídá množství metabolitů v buňce. Hypoxií indukovaný faktor HIF1 vyvolává reakci buňky na snížené množství kyslíku, proto má O_2 ve výpočtu vyšší váhu než ROS . Všechna látková množství v modelu jsou relativní a nabývají hodnot v rozsahu $<0, 1>$, proto je výsledek normalizován.

Poté je vypočteno množství faktoru HIF1, který je aktivován protein kinázou Akt a úrovní metabolismu, a je inhibován hydroxylázou PHD. Aby byl zachován relativní rozsah látek v modelu, je výsledek také normován podle vzorce

$$HIF1 = (1 - PHD) \cdot \frac{(Akt + M_i)}{2}, \quad (4.6)$$

kde Akt je logická hodnota vyjadřující nadprahové množství růstových faktorů, PHD je množství prolyl-hydroxylázy z rovnice 4.5 a M je metabolismus buňky i vypočtený v předchozí iteraci. HIF1 následně podle Obr. 4 nepřímo inhibuje pyruvát dehydrogenázu PDH, což je vypočteno jako $PDH = 1 - HIF1$.

Úroveň (rychlost) metabolismu M buňky i je ve vytvořeném modelu určena experimentálně jako

$$M_i = \frac{(RF + Z) \cdot prechod_G1 + PDH}{3}, \quad (4.7)$$

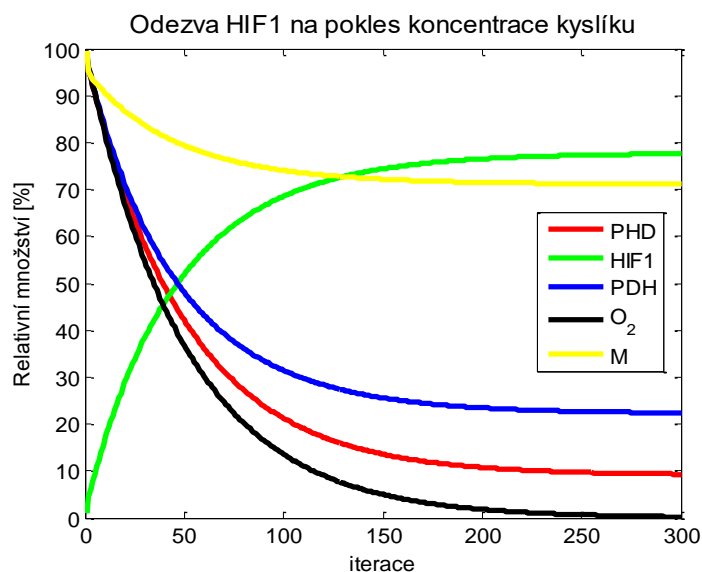
kde RF je množství růstových faktorů v okolí buňky, Z je množství dostupných živin, logická proměnná $prechod_G1$ určuje, zda je buňka připravena ke vstupu do buněčného cyklu a PDH je množství pyruvát dehydrogenázy, která je v živých buňkách přítomná v mitochondriích a katalyzuje rozklad pyruvátu na acetylkoenzym A – vstupní kofaktor Krebsova cyklu. Výsledek je opět normován pro zachování rozsahu $<0, 1>$.

Výstupem výpočtu metabolismu jsou, v závislosti na podmínkách v okolí buňky a nastavené rychlosti transportu látek přes membránu (viz dále), bezrozměrné hodnoty M_i v rozsahu od 0,29 pro nulové koncentrace látek po 0,96 pro 100% zastoupení živin, růstových faktorů i kyslíku. Z této hodnoty je následně podle rovnice $t = 1,96 - M_i$ vypočtena konstanta váhující délku buněčného cyklu. Předpokladem je, že zvýšené množství živin a růstových faktorů podněcuje proliferaci a buněčnou aktivitu, čímž je zkrácena délka cyklu. Naopak nedostatek živin dobu syntézy potřebných proteinů a růstové fáze G_1 a G_2 prodlužuje. Výsledné trvání cyklu je za nejpriznivějších podmínek 24 hodin [1] a za nejhorších, pokud buňka nepřejde do fáze G_0 , téměř 40 hodin.

Pro správné fungování modelu musí být zajištěn dostatečný odvod produktů metabolismu z buňky do extracelulárního prostředí. V reálných buňkách je tento proces zajištěn difuzí metabolitů do tkáňového moku a následným odváděním lymfatickým systémem a vlasečnicemi [37]. V navrženém modelu je každou iteraci přičítané množství metabolitů v buňce určeno jako polovina hodnoty M_i a jejich úbytek je realizován násobením uživatelsky nastavitelnou konstantou, standardně nastavenou na hodnotu 0,2, která simuluje permeabilitu buněčných membrán. Každou iteraci je tak množství metabolitů buňky sníženo o 80 %. Současně je zaznamenávána spotřeba živin buňky, jejíž princip je stejný jako v případě metabolitů – spotřebované množství odpovídá polovině M_i a pokles o 80 % v tomto případě simuluje transport živin do buňky.

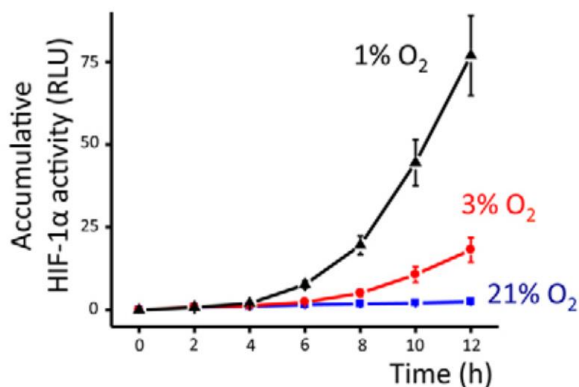
Navržený metabolický model byl simulován v programu Matlab. Na Obr. 16 je zobrazena změna množství faktoru HIF1 při exponenciálním poklesu koncentrace dostupného kyslíku s neměnným množstvím růstových faktorů a živin. Je vidět, že množství HIF1 je v optimálním případě se 100% relativním množstvím kyslíku (odpovídá 21 % v reálném prostředí) téměř nulové. Při poklesu koncentrace kyslíku však množství faktoru stoupá až na stabilní hodnotu 0,78. Zvýšené množství HIF1 v živých buňkách způsobuje expresi genů pro vytváření důležitých proteinů, které v reakci na hypoxii regulují

metabolismus. Na Obr. 16 je rychlost metabolismu označena žlutou barvou – je patrný pokles odpovídající sníženému množství kyslíku.



Obr. 16 - Odezva HIF1 na pokles množství kyslíku

Při srovnání s podobným modelem popisujícím signální dráhu HIF1 a její odezvu na změnu množství dostupného kyslíku (Obr. 17) lze pozorovat podobné vlastnosti. Za normální atmosférické koncentrace kyslíku je aktivita HIF1 inhibována degradací α -podjednotky, ale při hypoxii dochází k výraznému navýšení aktivity tohoto faktoru.

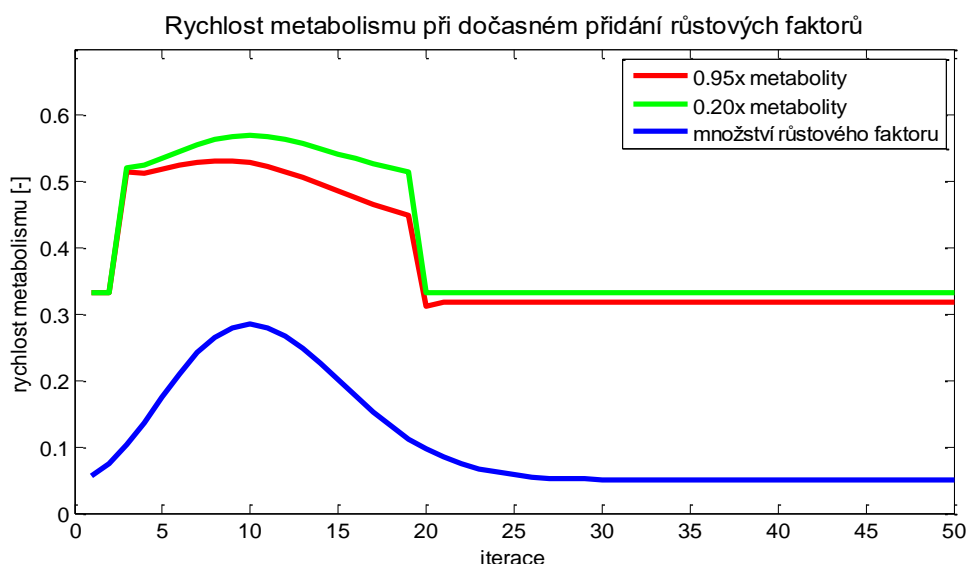


Obr. 17 - Aktivita HIF1 v závislosti na koncentraci kyslíku, převzato z [70]

Oproti srovnávanému modelu, který k výpočtům využívá ODE rovnice, je navržený logický model jednodušší, přičemž výsledek je podobný. Nevýhodou vytvořeného modelu je však okamžité získání výsledku bez časové dynamiky – zatímco v reálných buňkách trvá exprese genů desítky minut až hodin (v závislosti na délce genu a posttranslačních úpravách kódovaných proteinů), v probíhající simulaci se změna koncentrace kyslíku projeví okamžitě.

Testována byla také odezva metabolismu na dočasné navýšení množství růstových faktorů v prostředí buňky (Obr. 18 a Obr. 19). Na Obr. 18 jsou červeně a zeleně označeny průběhy rychlostí metabolismu s různým nastavením odvádění metabolitů z buňky a modrou barvou je vyznačeno množství růstových faktorů, na které buňka reaguje skokovým navýšením metabolismu. Při pomalejším odvádění vznikajících metabolitů se model přizpůsobuje snížením metabolismu, aby nedocházelo k poškození buňky. Naopak pokud je transport dostatečný, jediné omezení tvoří množství živin, kyslíku a růstových faktorů spolu s nastavenými prahy určujícími minimální množství látek, na které buňka reaguje. V simulaci bylo použito společné nastavení:

- 100 % kyslíku
- 50 % živin
- 80 % transport živin



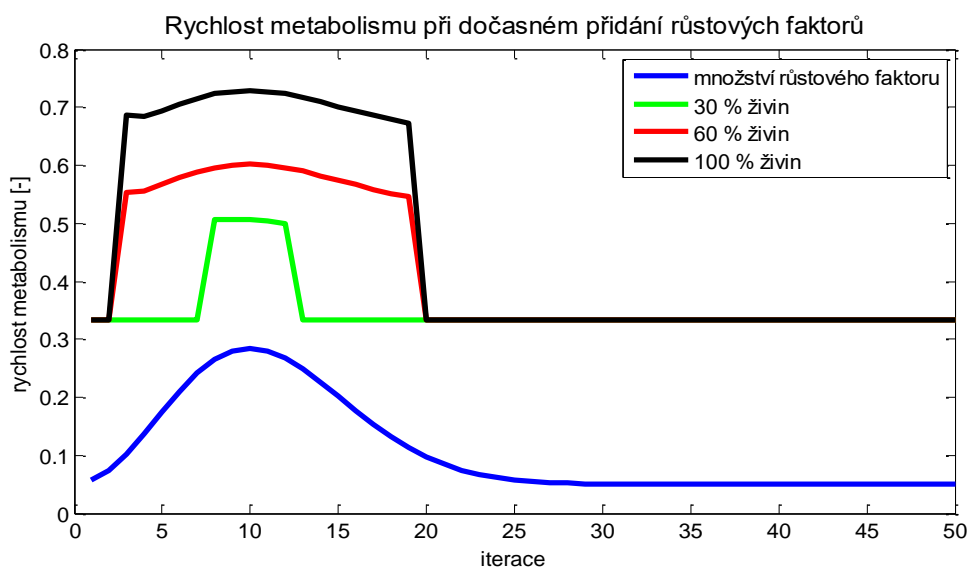
Obr. 18 - Odezva na růstový faktor při různé rychlosti odvádění metabolitů

Přestože má simulace pro oba průběhy, kromě rychlosti odvádění metabolitů, identické nastavení, metabolismus se po snížení množství růstových faktorů ustálí na různých hodnotách. Je to způsobeno vyrovnaním rychlosti transportu metabolitů z buňky s rychlostí jejich tvorby pomocí snížení metabolismu.

Na Obr. 19 je ukázka závislosti rychlosti metabolismu na různém množství dostupných živin. Při minimálním (nadprahovém) množství 30 % dochází jen ke krátkému navýšení metabolismu, ale při 60 % už je práh stejný jako při nejvyšším možném množství živin. Zvýšený metabolismus v navrženém modelu podle rovnice 4.7 odpovídá schopnosti buňky přejít do buněčného cyklu. Pokud je metabolismus minimální, odpovídá klidovému stavu buňky ve fázi G_0 .

V simulaci byla pro šíření růstového faktoru použita stejná funkce jako v předchozí simulaci s nastavením parametrů modelu:

- 100 % růstového faktoru
- 100 % kyslíku
- 80 % transport živin a metabolitů



Obr. 19 - Odezva na růstový faktor při různém množství dostupných živin

Regulace velikosti a počtu buněk

Aby nedocházelo k nadměrnému růstu nebo nekontrolované proliferaci buněk, je v modelu vytvořena regulace na principu vzájemného doplňování se signálních drah Hippo a PI3K-TOR (Obr. 7). Podobně jako v případě metabolismu, i tyto signální dráhy byly zjednodušeny a přizpůsobeny simulaci růstu kolonie buněk.

Aktivita protein kinázy TOR je regulována dostupnými růstovými faktory, živinami a kyslíkem [28]. Protože navržený model nevyžaduje přesné množství těchto látek, ale vystačí si s jejich relativní dostupností, je úroveň aktivity TOR určena jako

$$TOR = \frac{10 + \frac{Akt \cdot (RF + Z + O_2)}{3}}{10} - 0.05, \quad (4.8)$$

kde Akt je logickou hodnotou určující nadprahové množství růstových faktorů RF , Z je množství živin a O_2 množství kyslíku. Normalizace uvedenými konstantami zajišťuje, že výsledná aktivita TOR bude 95 % při minimu dostupných látek a 105 % při maximu. Touto hodnotou je následně váhován požadovaný poloměr buněk.

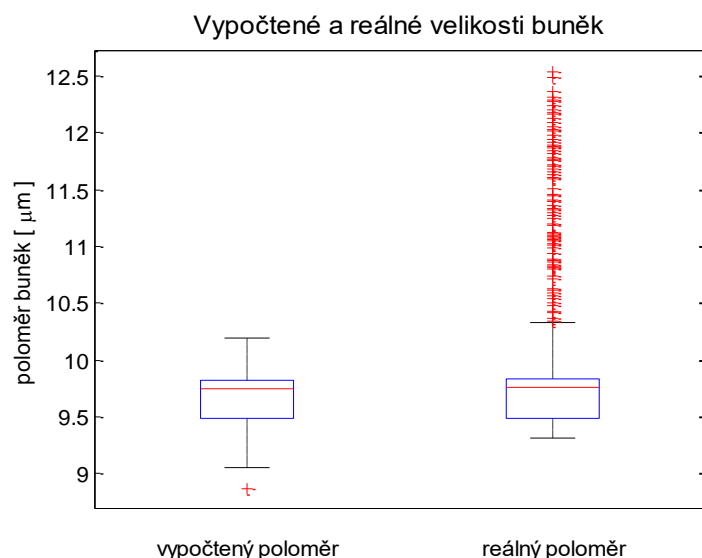
Vytvořený model růstu buněčných kolonií je univerzální a umožňuje úpravou parametrů simulovat více typů buněk. Požadovaná velikost buněk je tedy uživatelsky měnitelná s poloměrem standardně nastaveným na hodnotu 10 μm [71].

Velikost buněk je v průběhu simulace ovlivňována vnějšími vlivy, jejichž podíl na regulaci je dán hustotou prostředí a aktivitou protein kinázy TOR, ale i vnitřním stavem buňky – ve fázi G_0 je velikost buněk udržována podle požadovaného poloměru a v buněčném cyklu je poloměr zvyšován pro dosažení dvojnásobného objemu buňky podle rovnice 4.3. Požadovaný poloměr poz_r buňky i je vypočten podle rovnice

$$poz_r_i = (r_{0i} - \rho_i) \cdot TOR, \quad (4.9)$$

kde r_0 vyjadřuje uživatelem zadaný požadovaný poloměr buňky a TOR určuje vliv vnějších látek na rozměrech buňky. Proměnná ρ je odvozena z množství překryvů buňky i okolními buňkami a reprezentuje hustotu dané oblasti kolonie – čím více je překryvů, tím větší je hustota a tím menší je velikost buňky, čímž se lépe přizpůsobuje svému okolí.

Model regulace růstu byl otestován pro počáteční kolonii 100 buněk, které se po 10 000 iteracích rozrostly na konečných 3 328 buněk. Průměrná hodnota ρ pro celou kolonii byla na konci simulace 0,047 a velikost buněk tak regulovala především dostupnost živin. Simulace modelu proběhla ve vytvořeném programu a výsledná data byla zpracována v programu Matlab.



Obr. 20 - Rozdíl mezi vypočtenými a reálnými velikostmi buněk v modelu

Po simulaci byly srovnány vypočtené velikosti buněk poz_r s aktuálními poloměry r všech buněk v modelované kolonii. Z vykreslených boxplotů (Obr. 20) je patrné, že i když je medián obou skupin přibližně stejný (9,75 pro vypočtený a 9,76 pro reálný poloměr),

skupiny se výrazně liší svým rozptylem. Je to dáno tím, že ve vypočteném poloměru nejsou započítány nárůsty probíhající v buněčném cyklu. Na konci simulace přitom bylo 2 812 buněk ve fázi G_0 , 389 ve fázi G_1 a 125 buněk bylo v různé části buněčného cyklu, ve které je poloměr buněk postupně zvětšován a tím vznikají extrémy v boxplotu. Extrémně nízká hodnota v boxplotu vypočteného poloměru je způsobena dvěma nově rozdělenými buňkami, které se stále překrývají a mají vysokou hodnotu $\rho = 0,65$.

Vysoká hustota a malý prostor pro růst způsobuje v modelovaných buňkách poškození, které může v kombinaci s nedostatkem živin a růstových faktorů způsobit smrt buňky. Navržený model využívá funkčních principů signální dráhy Hippo – při vysoké hustotě buněk je jejich proliferace omezována a vstupují do klidové fáze G_0 . Stejně tak je zaznamenáváno poškození každé buňky kolonie.

Celkové poškození je vypočteno z dílčích částí způsobujících stresové namáhání buňky – z toxinů v prostředí, jejichž koncentrace a gradient je uživatelsky nastavitelný, z množství intracelulárních metabolitů a z hustoty oblasti ρ . Pokud poškození přesáhne polovinu uživatelsky nastavitelného prahu, buňka vstupuje do senescentní fáze G_0 a není jí umožněno vrátit se do buněčného cyklu. Při překročení celé hodnoty prahu je buňka ze simulace odstraněna procesem apoptózy.

Modelování tumorů

Rakovinné buňky jsou charakteristické svou nekontrolovanou proliferací a invazivitou do okolní tkáně. Ve vytvořeném modelu jsou tyto buňky postaveny na stejném principu jako buňky zdravé, ale mají uživatelsky volitelná nastavení, která ovlivňují rychlost buněčného cyklu a reakci buněk na poškození.

Výraznou změnou oproti zdravým buňkám je vlastní tvorba růstových faktorů, jejichž množství je tak vždy 100 % a buňka je neustále stimulována ke vstupu do buněčného cyklu a k dělení. Navíc je podle rovnice 4.7 zvýšen metabolismus a zrychlen buněčný cyklus. Rakovinné buňky se tak dělí rychleji než buňky zdravé. K dalšímu zrychlení cyklu přispívá i vyšší exprese intracelulárních proteinů, která nastává při deregulaci transkripčních faktorů v jádře [24]. Každý nádor se chová jinak, a proto byla volba rychlosti dělení buněk tumorů ponechána na uživateli; standardní nastavení je 0,95násobek délky cyklu zdravé buňky.

V modelu je implementován i princip tumor supresorů, jejichž úkolem je zabránit dalšímu růstu rakovinných buněk. Při jejich povolení je s buňkami tumoru zacházeno jako s poškozenými a podstupují apoptózu. Naopak, pokud jsou tumor supresory uživatelem zakázány, buňky tumoru nereagují na inhibici růstu dotykem s okolními buňkami a neomezeně se dělí, bez přechodu do fáze G_0 .

4.3. Definice prostoru v modelu

Vytvořený model buněčné kolonie je trojrozměrný a vyžaduje přítomnost živin, kyslíku a růstových faktorů, bez kterých modelované ani živé buňky nejsou schopny přežít. Pro snížení paměťových nároků jsou výpočty relativních množství těchto látek zadány parametricky – pokud by byly zadány absolutními hodnotami v souřadném systému, bylo by nutné pro větší kolonie buněk generovat pole o velikosti např. 500 x 500 x 500, což při předpokladu velikosti paměťového bloku 8 bytů (formát double [72]) odpovídá velikosti cyklicky procházené paměti téměř 1 GB pro jedinou zastoupenou látku v modelu. Výhodou tohoto přístupu je možnost měnit množství látek na konkrétních místech v prostoru simulace, ale vzhledem k výpočetní náročnosti zpracování velkých trojrozměrných matic byly použity parametrické rovnice.

Pro simulování různých dějů jsou k dispozici čtyři modely prostorového rozložení látek, přičemž pro množství kyslíku, živin i růstového faktoru jsou použity stejné výpočty. První volbou je ideální rozptyl všech látek, jejichž relativní množství je v každém bodě simulovaného prostoru konstantní. Tento režim umožňuje pozorovat růst buněčné kolonie, která je limitována jen metabolismem a inhibicí růstu kontaktem s okolními buňkami.

Další možností je plošný model, v němž se množství látek snižuje s přibývajícím vzdáleností na ose y . Je tak simulován růst buněk na rovině, kterou může být např. agarózový gel v petriho misce. Výpočet množství látek M má podobu

$$M = \frac{1}{2} \frac{|y|}{k}, \quad (4.10)$$

kde y je pozice buňky na ose y a k je uživatelsky nastavitelná konstanta určující rychlost poklesu množství látek v závislosti na přibývajícím vzdálenosti. Na Obr. 21a je zobrazen výsledný gradient pro rozsah $\langle -100, 100 \rangle$ s maximem látek zbarveným bíle a minimem v daném rozsahu černě. Pohyb buněk pod rovinu plochy je uživatelsky nastavitelný v konfiguračním souboru modelu.

Třetí volbou je model cévy, který umožňuje sledovat závislost růstu buněk na koncentraci látek v prostoru. Buňky rychleji proliferují v oblastech s vysokým zastoupením látek a kopírují tak tvar cévy, která je jejich zdrojem. Pro snadnější viditelnost tohoto efektu byla jako tvar cévy zvolena spirála podle rovnice

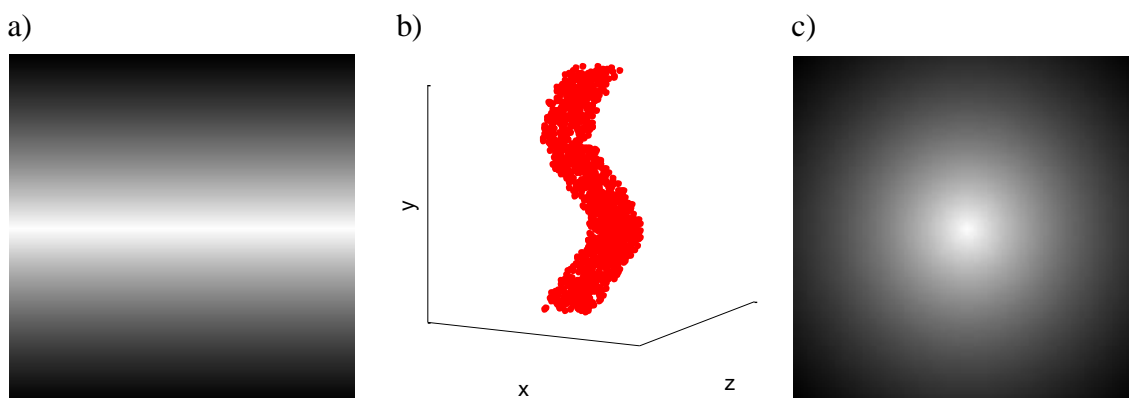
$$M = e^{-\frac{\sqrt{(20 \cdot \sin(\frac{y}{40}) - x)^2 + (20 \cdot \cos(\frac{y}{40}) - z)^2}}{k}}, \quad (4.11)$$

kde x , y a z jsou souřadnice polohy buňky a k je opět nastavitelná konstanta pro změnu velikosti gradientu. Tvar vytvořené cévy je zobrazen na Obr. 21b. Pro vykreslení byla v Matlabu použita funkce `scatter3` a náhodným prohledáváním je zobrazeno množství látek nad 80 %.

Dalším navrženým modelem rozložení látek v prostoru je bodový zdroj živin popsáný rovnicí

$$M = e^{-\frac{\sqrt{x^2+y^2+z^2}}{k}}, \quad (4.12)$$

kde x , y a z jsou souřadnice buňky a k umožňuje nastavit velikost gradientu přechodu z maximální do minimální koncentrace látek. Na Obr. 21c je zobrazen centrální řez gradientem tohoto modelu v rozsahu $\langle -100, 100 \rangle$ s bílou barvou označující nejvyšší a černou nejnižší množství látek v daném rozsahu. Pro toto i předchozí zobrazení byly použity hodnoty $k = 100$.



Obr. 21 - Zobrazení modelů rozložení látek v prostoru: a) plocha, b) céva, c) bod

Množství látek v prostoru lze lineárně snižovat uživatelsky nastavitelnou konstantou *pokles*, která je odečítána od vypočteného množství. Tímto způsobem je možné simulovat i reálné situace, kdy relativní množství látek u zdroje (cévy) není 100 %.

Pro zmenšení simulované oblasti je možné nastavit prostorové omezení, které buňkám nedovoluje se posunout za určenou vzdálenost od středu kolonie. Tímto způsobem lze omezit počet buněk, které se simulují, a snížit tak výpočetní náročnost. Buňkám na hranici omezení je přičítán počet dotyků, kterým jsou spojeny s okolními buňkami, čímž je simulováno jejich umístění uprostřed kolonie. Celou simulovanou kolonii buněk si tak lze představit jako výřez z mnohem větší skupiny buněk tvořící tkáň a orgány. Způsob omezení je automaticky volen podle typu rozložení látek – pro plošný model má tvar válce a pro všechny ostatní má omezení podobu koule.

4.4. Model pohybu buněk

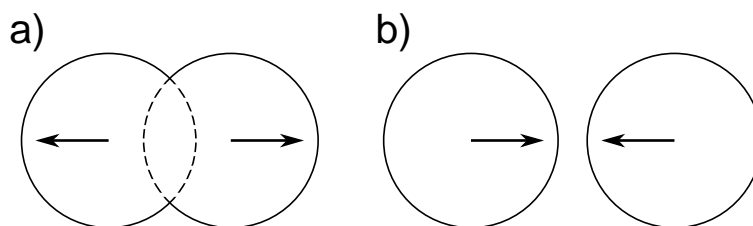
Při růstu buněk ve tkáni je důležité, aby byly v rovnováze jejich počet, velikost a rychlost růstu. V živém organismu tyto regulace probíhají prostřednictvím signálních drah řídících proliferaci buněk a jsou závislé na vzájemných mezibuněčných interakcích, především na adhezi a tlaku vyvíjeném na buňku. Pro klinicky přínosné modelování růstu buněk *in silico* je tedy nutné, aby se blízké buňky v simulaci vzájemně ovlivňovaly a byly na sebe svými membránami pevně navázány, čímž jsou vytvářeny aproximace živých tkání a kompaktních struktur, např. tumorů (Obr. 12).

Vytvořený model pohybu buněk umožňuje simulovat vzájemné interakce v kolonii buněk, včetně jejich dělení a apoptózy. Jednotlivé buňky jsou v modelu reprezentovány koulemi se známou polohou v prostoru $[x, y, z]$ a aktuálním poloměrem r , který se v průběhu simulace z důvodu růstu a zániku buněk neustále mění. Algoritmus pohybu buněk proto přímo navazuje na výpočet buněčného cyklu a je opakovaně spouštěn v každé iteraci probíhající simulace.

Z prostorových souřadnic je nejdříve vypočtena vzájemná euklidovská vzdálenost vzd všech buněk v kolonii podle rovnice

$$vzd_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} - (r_i + r_j), \quad (4.13)$$

kde i je aktuální buňka, j je buňka, ke které je počítána vzdálenost a r je poloměr buněk. Výsledkem je vzdálenost mezi membránami buněk, která může být záporná při překrytí buněk (Obr. 22a) a kladná při větší mezeře mezi buňkami (Obr. 22b).



Obr. 22 - Znázornění pohybu modelovaných buněk

Překryv modelovaných buněk nastává při jejich dělení nebo při posunu okolních buněk jedním směrem. V takovém případě je nutné buňku posunout do místa s nejnižší hustotou (nejmenším překryvem buňky). Toho je docíleno tak, že ke každé buňce, se kterou se buňka překrývá, je vypočítána energie pohybu

$$E_{ij} = \frac{1}{100} \cdot (1 - e^{vzd_{ij}}) \quad (4.14)$$

odpovídající velikosti překryvu. Velikost energie je snížena pro plynulý pohyb buněk – skoková změna by způsobila oscilace v celé kolonii. Celková energie a směr pohybu \bar{E}_i jsou dány rovnicí

$$\bar{E}_i = \sum_{j=1}^n \overline{vzd}_{ij} \cdot E_{ij}, \quad (4.15)$$

kde n je počet okolních buněk a \overline{vzd}_{ij} vyjadřuje dílčí vzdálenost obou buněk ve směrech osy x , y a z . Buňka je následně o vypočítanou hodnotu energie posunuta ve směru nejmenších překryvů, čímž se dostává do oblasti s nižší hustotou a, pokud není inhibována nedostatkem živin nebo růstových faktorů, může se dále dělit nebo růst.

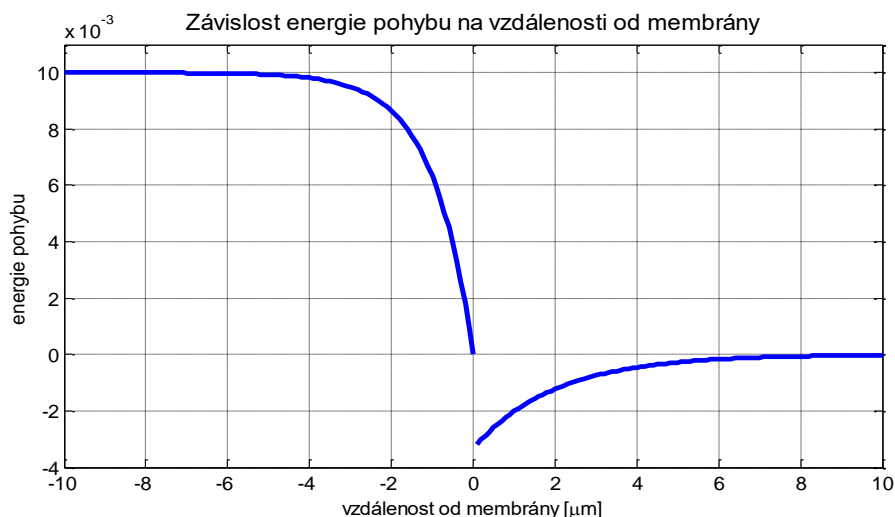
Pokud jsou od sebe buňky vzdáleny, působí na ně adhezní síly a začnou se svými membránami přibližovat. Algoritmus výpočtu je v takovém případě stejný jako při překryvu a energie pohybu ke každé blízké buňce je vypočtena podle rovnice

$$E_{ij} = \frac{1}{300} \cdot \frac{-1}{e^{\frac{vzd_{ij}}{2}}}, \quad (4.16)$$

kde vzd_{ij} je vzdálenost membrán buněk a konstanta $1/300$ je použita pro zmenšení kroku pohybu v probíhající simulaci. Konečný směr a velikost pohybu buňky jsou vypočítány opět pomocí rovnice 4.15, jejíž výsledek je přičten k aktuální poloze buňky i .

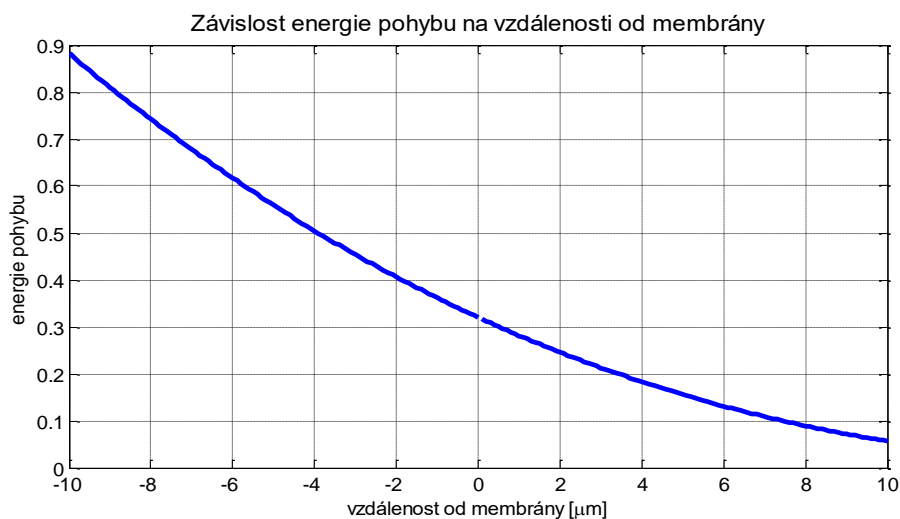
V simulované kolonii buněk často dochází k oběma případům zároveň – buňka může být z jedné strany utlačována a z druhé je od nejbližších buněk svou membránou vzdálena. Počítány jsou proto oba typy pohybu (směrem od i k buňce) a vybírán je ten s větší energií, přičemž preferován je pohyb směrem od buňky. V kombinovaném zobrazení závislosti energie pohybu na vzdálenosti od membrány buňky je patrné (Obr. 23), že energie pohybu směrem od buňky je v případě velkého překryvu větší než pohyb k buňce. Je tak zajištěno, že se dělící se buňky skutečně rozdělí a nezůstanou nadměrně překryté. Směrem k membráně se energie postupně snižuje a na samotné membráně je nulová – pokud se buňky jen dotýkají,

vzájemně se nepohybují. Při přibližování se k membráně vně buňky absolutní hodnota energie roste, čímž je simulována adheze, která buňky udržuje u sebe a v živých organismech napomáhá tvarovat tkáně a orgány [41].



Obr. 23 - Energie pohybu v závislosti na vzdálenosti od membrány

Energie pohybu v navrženém modelu vyjadřuje krok, kterým je váhována vzdálenost mezi membránami sousedních buněk a o který se buňka v aktuální iteraci posune ve směru nejmenšího překrytí. Navržený způsob simulace intercelulární dynamiky je experimentální s empiricky určenými konstantami a reálnou adhezi buněk, stejně jako dříve popsané rovnice 3.8 a 3.11, jen aproximuje. Testovány byly i jiné způsoby výpočtu pohybu buněk v prostoru, ovšem s navrženým modelem byly v kombinaci s použitými signálními drahami a modelovanými jevy získány nejlepší výsledky. Příklad testovaného modelu pohybu buněk podle [47] je na Obr. 24. Model nerozlišuje mezi vnitřním a vnějším prostředím membrány a ve větších vzdálenostech jsou výsledkem komplexní hodnoty, proto nebyl použit.



Obr. 24 - Testovaný model pohybu buněk

4.5. Vytvoření programu pro vizualizaci modelu

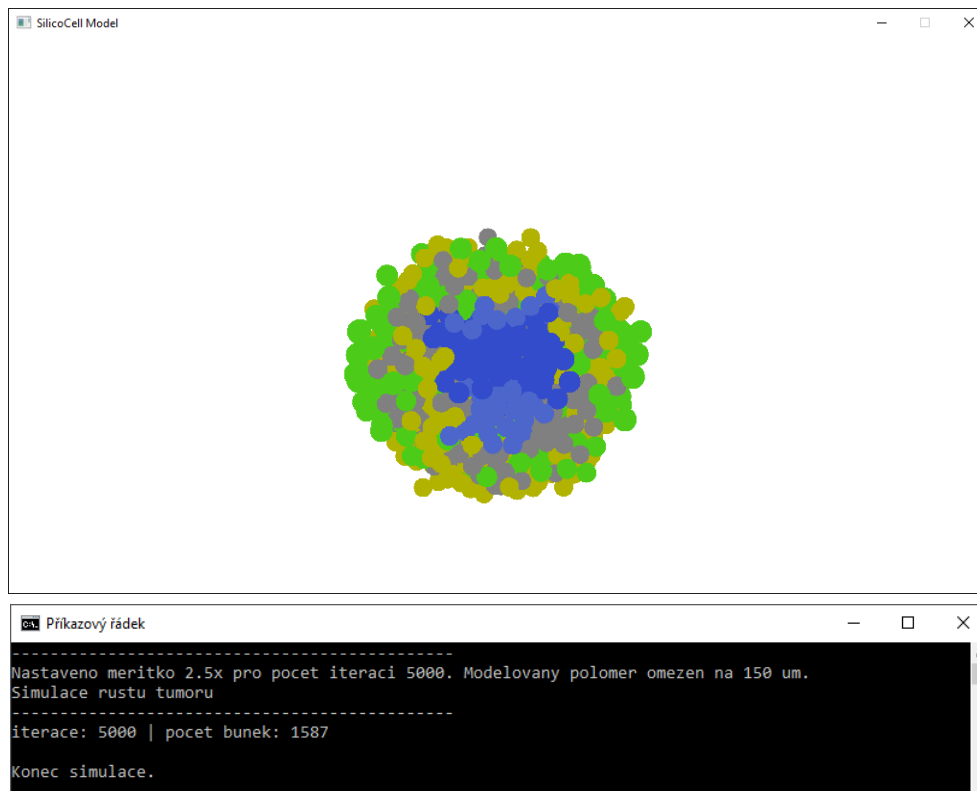
Pro zobrazování simulovaných buněčných kolonií a snadné nastavování parametrů modelu byl za pomoci jazyka C++ a OpenGL knihovny SFML vytvořen program ovládaný pomocí standardního příkazového řádku operačního systému Microsoft Windows (Obr. 25). Jazyk C++ byl vybrán kvůli svému velkému rozšíření a kompatibilitě mezi platformami. Navíc je k dispozici velké množství freeware editorů a kompilátorů, díky kterým lze vytvořený program prostřednictvím úpravy zdrojových souborů snadno upravovat a rozšiřovat i nad rámec standardně dostupných uživatelských nastavení.

Uživatel má po spuštění programu možnost vybrat si z několika přednastavených režimů, nebo si může parametry simulace nastavit podle vlastních preferencí a požadavků. Nejčastěji upravovaná nastavení (počet iterací, měřítko časového urychlení, prostorové omezení simulace, model rozložení látek a modelování tumoru) jsou měnitelná přímo v příkazové řádce při spouštění simulace. Rozšířená nastavení ovlivňující chování modelu jsou pak umístěna v souboru *config.ini*, který je automaticky vytvářen při prvním spuštění programu a je možné jej upravovat v libovolném textovém editoru. Provedené změny se pak projeví při dalším spuštění programu. Mezi tato nastavení patří např. rozměr buněk, velikost kolonie generované na začátku simulace, délka jednotlivých fází buněčného cyklu a další.

Dalšími automaticky generovanými soubory jsou *log.txt*, do kterého jsou ukládány veškeré provedené akce, *pocty.txt* s aktuálním počtem různých stavů buněk v každé proběhlé iteraci a soubor *kolonie.dat*, ve kterém jsou ukládány veškeré informace o kolonii – na každém řádku v souboru je uložena poloha buňky, její velikost, doba života, úroveň metabolismu a veškeré prahy a parametry pro vyhodnocení signálních drah. Hodnoty jsou odděleny tabulátorem a je tak možné je dále zpracovávat např. v programu Excel, Matlab apod. Protože by opakované ukládání tohoto souboru v každé iteraci zbytečně zpomalovalo simulaci, k uložení dojde, jen když uživatel stiskne klávesu **S**. Generovaný soubor obsahuje kompletní informace o kolonii a je tak možné při jeho načtení v simulaci pokračovat. K tomu slouží klávesa **N**, po jejímž stisknutí dojde k přepsání aktuálně modelované kolonie kolonií uloženou dříve. Aby bylo možné lépe pozorovat rozrůstání tumoru uprostřed kolonie živých buněk, které jej ve standardním zobrazení zakrývají, lze způsob zobrazení (celá kolonie nebo pouze buňky tumoru) přepínat levou klávesou **Ctrl**. Celou simulaci je možné pozastavit klávesou **P**.

Zobrazení simulované buněčné kolonie je realizováno v samostatném okně, ve kterém jsou buňky vykresleny v trojrozměrném prostoru jako koule s různým poloměrem a barvou odpovídající stavu buněk – buňky ve fázi G_0 jsou zbarveny šedě, v G_1 žlutě, v buněčném cyklu zeleně a v apoptóze červeně. Tumor je ve všech fázích označen modrými barvami.

Protože je zobrazení trojrozměrné, je možné vykreslenou kolonii buněk po stisknutí levého tlačítka myši otáčet. Pravým tlačítkem myši a pohybem od/k monitoru lze volit řez zobrazením (Obr. 25 nahoře) pro pohodlnější sledování vnitřních buněk kolonie.



Obr. 25 - Řez simulovanou kolonií s tumorem, výpis z příkazového řádku

Program byl napsán a zkompileován v Microsoft Visual Studiu, přičemž pro větší kompatibilitu bylo zvoleno 32bitové sestavení. Zdrojové soubory jsou *main.cpp* (uživatelské rozhraní, hlavní cyklus simulace a vykreslení), *bunky.cpp* (výpočet signálních drah a pohybu buněk), *bunky.h*, *vypocty.cpp* (výpočet množství látek v prostoru) a *vypocty.h*. Soubor *bunky.exe* je spustitelný přes příkazový řádek, přičemž připsáním parametrů za název programu je možné vyvolat nápovědu (zápis jako *bunky.exe -h*) se stručným popisem ovládání programu a způsobem zadávání nastavení simulace, nebo spouštět různé přednastavené režimy, mezi kterými nechybí růst tumoru uprostřed kolonie zdravých buněk, obnova poškozené oblasti kolonie nebo simulace cílené genové terapie.

Parametr -n: načtení uložené kolonie buněk

Tento režim slouží k zobrazování již vytvořených kolonií, které jsou uloženy v souboru *kolonie.dat* ve složce s programem *bunky.exe*. Soubor s uloženou kolonií lze upravovat v libovolném textovém editoru a je tak možné ihned zobrazit vliv provedené změny.

Parametr -p: růst tumoru

V tomto demonstračním režimu, při spouštění programu zadávaném jako `bunky.exe -p`, je simulován růst tumoru spolu se zdravými buňkami. Hned v první iteraci je generována kolonie 99 zdravých buněk s jednou tumorovou uprostřed. Prostor je definován plošným modelem rozložení látek a omezením do šířky 100 μm . Počet prováděných iterací je 5 000 a časové měřítko, určující n-násobné zkrácení všech časů v modelu, je 2,5 (tzn. místo standardní délky buněčného cyklu 1440 iterací/24 hodin je doba zkrácena na 576 iterací).

Parametr -p1: mutace buňky

Zadáním příkazu `bunky.exe -p1` je spuštěn režim modelování mutace buňky ve tkáni. Vybrána je vždy buňka nejbližší středu kolonie zdravých buněk, které proliferovaly až do ustálení, které nastává, když je více než 90 % buněk ve stavu G_0 . Následně je vybraná buňka označena za tumorovou a není nadále omezena množstvím dotyků s okolím. Nastaven je počet iterací 10 000, do jejichž dokončení musí dojít k ustálení počáteční kolonie, a dalších 5 000 po vzniku mutace. Časové měřítko je nastaveno na hodnotu 4, použitý je plošný model rozložení látek a simulovaný prostor je omezen do vzdálenosti 100 μm .

Parametr -p2: oprava poškození

Režim opravy poškození se snaží napodobit hojení ran v živé tkáni. Po ustálení proliferace (90 % buněk ve stavu G_0) je čtvrtina buněk kolonie označena pro apoptózu a postupně odstraněna ze simulace. V uvolněném místě není růst buněk inhibován dotyky s okolím a prostor je postupně vyplněn novými buňkami. Nastaven je opět počet iterací 10 000 do ustálení a 5 000 po poškození. Časové měřítko je 4 a plošný model je omezen do 100 μm .

Parametr -p3: vytvoření dutiny

Spuštěním programu s tímto parametrem je zahájena simulace tvorby dutiny podobně, jako jsou vytvářeny duté orgány v reálných organismech [73]. Proces generování a ustálení počáteční kolonie je stejný jako v předchozích režimech. Po ustálení dochází k řízené apoptóze buněk uprostřed kolonie. Apoptóza je spouštěna zvyšováním poškození centrálních buněk, přičemž model rozložení látek je bodový se středem uprostřed kolonie.

Parametr -p4: reaktivace tumor-supresorů

Program po zadání příkazu `bunky -p4` zahájí simulaci cílené léčby, která reaktivací mutovaného proteinu p53 zničí rostoucí tumor [74]. Nejprve je vytvořena stabilní kolonie, poté je mutací jedné buňky zahájen růst nádoru, a nakonec jsou po dosažení 200 buněk reaktivovány tumor-supresory. Časové měřítko je 4 a bodový zdroj není prostorově omezen.

Uživatelské nastavení simulace

Kromě přednastavených režimů je možné program v příkazové řádce spouštět přímo jako `bunky.exe`. Tento příkaz vypíše správný formát zadávaných parametrů pro uživatelskou simulaci spolu se zkratkami pro spuštění podporovaných režimů (Obr. 26).

Obr. 26 - Spouštění simulace z příkazového řádku

Kromě základních uživatelských nastavení pomocí parametrů je možné měnit i podrobná nastavení modelu v souboru `config.ini`: (veškeré časy jsou zadávány v minutách)

- `t_G1` – délka fáze G_1
- `t_S` – délka fáze S
- `t_G2` – délka fáze G_2
- `t_M` – délka fáze M
- `t_Apop` – délka procesu apoptózy
- `t_cekani` – doba syntézy proteinů pro výstup z fáze G_0
- `ukladani` – logické zapnutí/vypnutí ukládání obrázků v intervalu 1 000 iterací
- `korekce_r` – korekce vykreslované velikosti buněk pro monitory s vysokým DPI
- `prostor` – úprava gradientu prostorových modelů látek (konstanta k)
- `pokles` – lineární snížení množství látek v prostoru
- `kolonie` – počet buněk generovaných na začátku simulace
- `r_bunek` – požadovaný poloměr buněk
- `t_tumor` – zkrácení buněčného cyklu tumoru
- `poc_dot` – počet dotyků, při jejichž překročení buňka vstupuje do fáze G_0
- `transport` – nastavení permeability membrány buňky
- `oprava` – poškození buňky, které je opraveno za jednu iteraci
- `rovina` – logický přepínač omezení pohybu buněk pod rovinu $y = 0$
- `supresory` – logický přepínač povolení tumor supresorů
- `poskozeni` – práh poškození buňky, po jehož překročení dochází k apoptóze
- `prah_ap` – práh pravděpodobnosti apoptózy v kontrolních bodech buňky

5 TESTOVÁNÍ MODELU

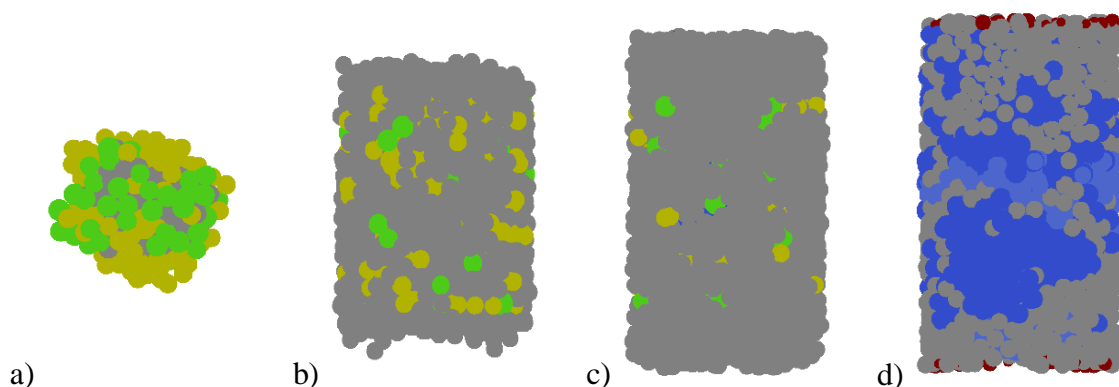
Vytvořený model byl otestován pro různé kombinace nastavení s cílem co nejvíce se přiblížit chování reálných buněk v lidském těle. Simulace byly spouštěny na počítači se čtyřjádrovým procesorem s taktem 3,8 GHz a 8 GB RAM. Výsledkem každé z provedených simulací je zobrazení výsledné kolonie buněk a vytvoření souborů *pocty.txt* a *kolonie.dat* se všemi nezbytnými údaji o buňkách. Tyto soubory byly následně zpracovány v programu Matlab.

Vytvoření tumoru mutací jediné buňky

Mutace v živých buňkách mohou vznikat chybami při replikaci DNA nebo poškozením DNA toxiny či ionizujícím zářením. Pokud není mutace opravena nebo nedojde k apoptóze, vznikne nekontrolovaným dělením této mutované buňky tumor. Pro tento test, který simuluje vznik mutace v tumor-supresorové signální dráze a v regulaci buněčného cyklu, byl využit přednastavený režim p1 s následujícím standardním nastavením:

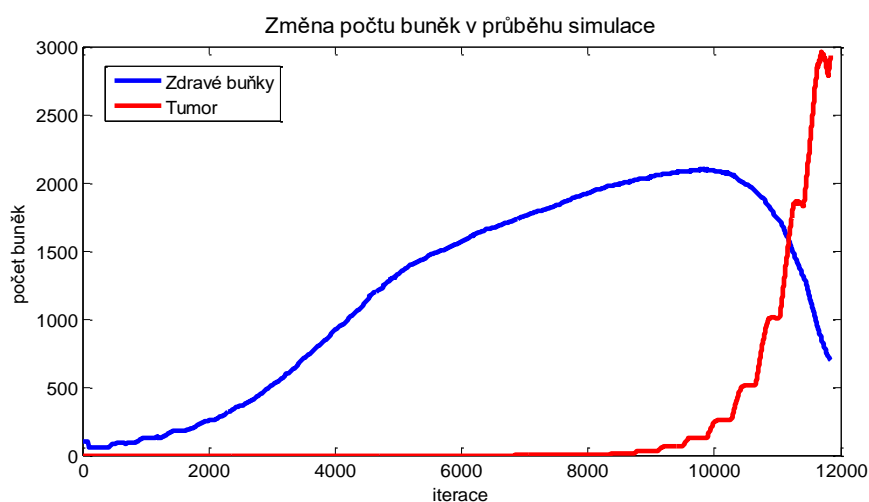
- Délka cyklu zdravé buňky: 24 hodin
- Délka cyklu buňky tumoru: 22,8 hodin
- Prostorový gradient: $k = 100$
- Lineární snížení množství látek: 0,2
- Počáteční množství buněk: 100
- Průměr buněk: 10 μm
- Rychlost transportu látek: 0,8
- Oprava poškození: 0,001
- Práh poškození buněk: 0,5
- Práh apoptózy zdravých buněk: 0,005
- Plošný model rozložení látek
- Prostorové omezení do vzdálenosti: 100 μm
- Časové měřítko: 4x

V simulaci, která trvala 6 131 sekund, bylo provedeno 6 842 iterací do ustálení kolonie zdravých buněk, a poté byla jedna buňka změněna na nádorovou. V následujících 5 000 iteracích (téměř 14 dní reálného času) došlo k výraznému nárůstu tumoru, který svým objemem vytlačil velkou část zdravých buněk mimo oblast s dostatkem živin a způsobil tak jejich apoptózu (Obr. 27 a Obr. 28). Objem tumoru, který na konci simulace tvořilo 2 932 buněk, je 0,013 mm^3 . Z důvodu prostorového omezení, kvůli kterému má výsledná kolonie tvar válce, však i některé tumorové buňky podstoupily apoptózu a jejich celkový počet byl tak při použití jiného prostorového modelu vyšší (viz dále).



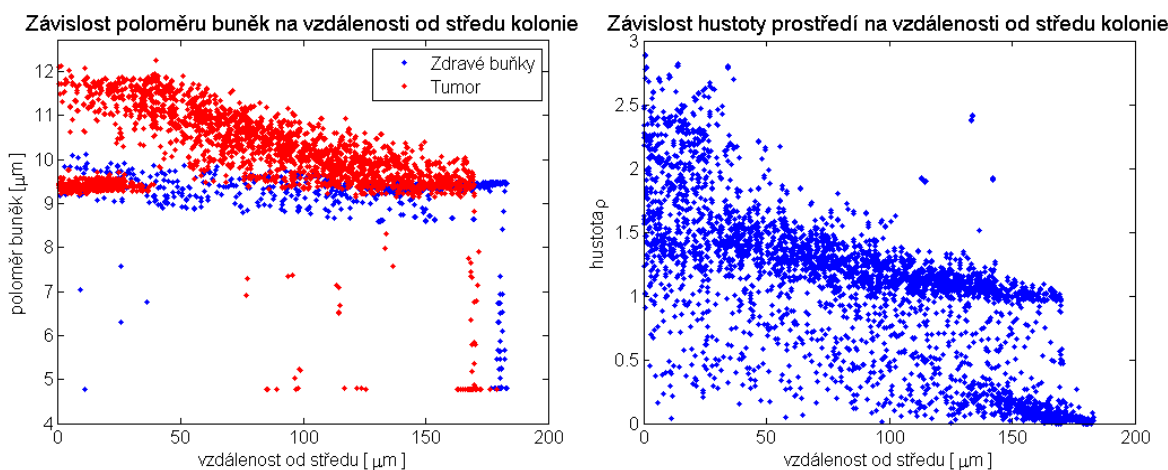
Obr. 27 - Režim p1 po a) 2 000, b) 6 000, c) 10 000 iteracích a na konci simulace (d)

V zobrazení vývoje počtu buněk na Obr. 28 je patrný počáteční exponenciální nárůst zdravých buněk, jejichž proliferace zpočátku není omezena nedostatkem potřebných látek ani omezeným prostorem pro růst. Po přibližně 5 000 iteracích dochází ke zpomalení dělení buněk a kolonie se stabilizuje do rovnovážného stavu – buňky blízko zdroje živin jsou inhibovány nedostatkem prostoru a buňky vzdálené od středu nemají dostatek nezbytných látek. V iteraci 6 843 byla jedna buňka uprostřed kolonie zmutována na buňku tumorovou. Její proliferace je rychlejší, protože si vytváří vlastní růstové faktory a není omezena nedostatkem prostoru ani tumor-supresory. Tumor roste exponenciálně a velmi rychle ve středu simulace nahrazuje zdravé buňky. Skoky v počtu buněk tumoru, které jsou vidět i na začátku růstu zdravých buněk, jsou způsobeny tím, že mají malý počet mateřských buněk v jediném stavu buněčného cyklu a dělí se tak v přibližně stejnou dobu.



Obr. 28 - Změna počtu buněk, režim p1, plošný zdroj látek

Na Obr. 29 je zobrazena závislost poloměru buněk r na vzdálenosti od středu kolonie, kde je nejvyšší množství růstových faktorů, živin a kyslíku. Středem je u plošného modelu rozložení látek v prostoru rovina, takže vzdálenosti od středu kolonie v tomto případě odpovídá poloha na ose y . V grafu je vidět, že zatímco tumorové buňky stále vstupují do buněčného cyklu (vyšší poloměr blíže středu), zdravé buňky zůstávají ve fázi G_0 a svoji velikost spíše snižují. Shluk tumorových buněk v oblasti středu kolonie tvoří právě rozdělené buňky, které jsou jako světle modrý pás vidět i na Obr. 27d. Všechny buňky s poloměrem menším než $8,5 \mu\text{m}$ jsou v procesu apoptózy. Nejvíce umírajících buněk je ve vzdálenosti přibližně $170\text{--}180 \mu\text{m}$ od středu. V této oblasti je jen velmi málo látek, které buňka potřebuje k přežití. Tumorové buňky navíc kvůli rychlejšímu metabolismu, a tedy i vyšší spotřebě živin, umírají dříve než buňky zdravé.

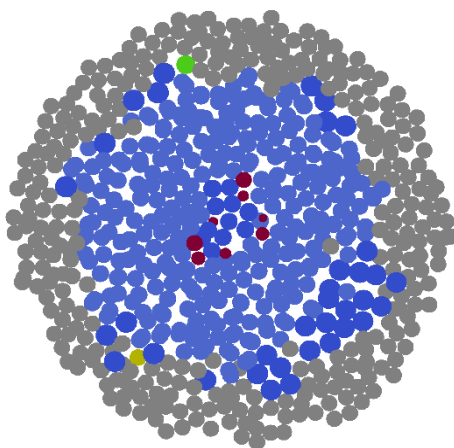


Obr. 29 - Závislost r a ρ buněk na vzdálenosti od plošného zdroje živin, režim p1

V grafu závislosti hustoty ρ na vzdálenosti od zdroje živin (Obr. 29) je vidět, že největší hustota buněk (nejvíce překryvů) je v centru kolonie, kde právě dochází k dělení nových rakovinných buněk. Se zvyšující se vzdáleností klesá míra překrytí a na okraji kolonie, kde jsou především zdravé buňky a buňky podstupující apoptózu, je překryv blízký nule. Vysoká hustota prostředí v modelu způsobuje buňce poškození, které by mělo vyvolat apoptózu nebo přechod do nevratné fáze G_0 . Rakovinné buňky však mají v této simulaci deaktivované tumor-supresory, takže se dále dělí, dokud jejich poškození nepřekročí hodnotu nastavenou na 50 %. V závislosti poloměru r na vzdálenosti od středu na Obr. 29 je tak vidět, že apoptóza buněk tumoru nastává až po delší době, po jejich odsunutí dál od aktivního středu kolonie.

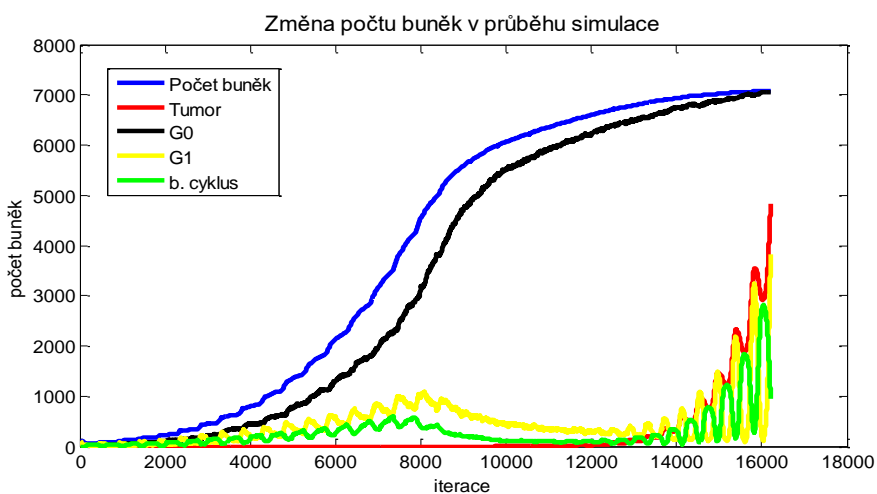
Simulace růstu tumoru byla provedena i pro bodový model rozptřeni látek v prostoru s následující změnou nastavení: růst kolonie buněk není prostorově omezen a $k = 250$. S tímto nastavením bylo provedeno 9 750 iterací do ustálení kolonie a 6 461 iterací po vytvoření mutace. Simulace byla ukončena předčasně z důvodu exponenciálně rostoucího počtu buněk a tedy i času potřebného k výpočtu jednotlivých iterací. Celková doba simulace

byla 20 hodin s konečným počtem všech buněk 11 910, které tvoří objem 0,048 mm³. Řez kolonií je zobrazen na Obr. 30, kde je patrné výrazné rozrůstání tumoru. Uprostřed tumoru je velmi málo prostoru pro dělení, ale protože je zde předpoklad mutace signální dráhy omezující proliferaci v těchto podmínkách, rakovinné buňky se dále dělí a kvůli následnému poškození z důvodu velkého překrytí podstupují apoptózu. V reálných tumorech je apoptózou, podobně jako ve vytvořeném modelu, uvolňováno místo pro další proliferaci. Navíc jsou však tímto způsobem vybírány nejodolnější a nejinvazivnější buňky tvořící maligní tumory [75].



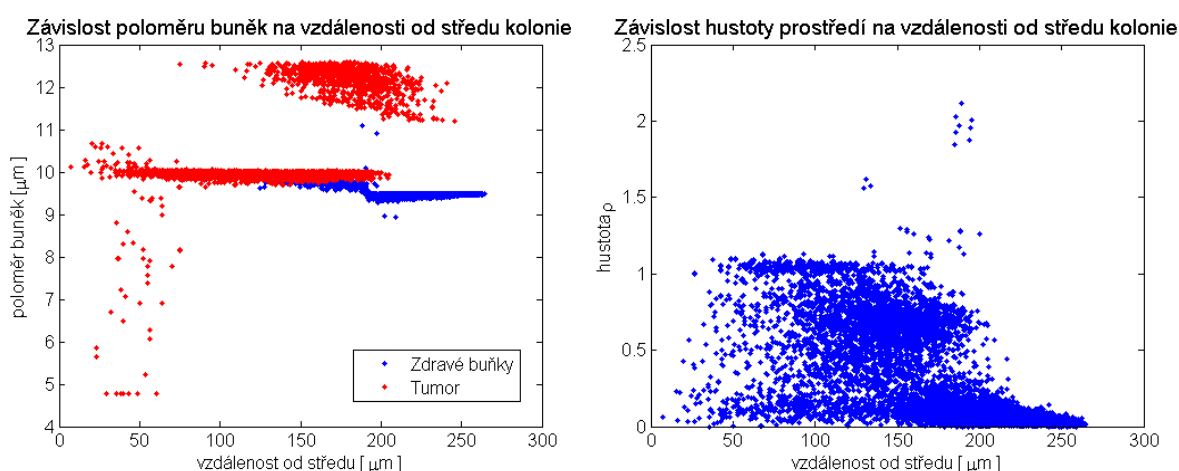
Obr. 30 - Řez tumorem ve tkáni, bodový zdroj látek

Vývoj počtu buněk v průběhu simulace je zobrazen na Obr. 31. Počet zdravých buněk je zobrazen modře a počet buněk tumoru červeně. Protože jsou zdravé buňky vytlačovány do okrajových oblastí s podprahovým množstvím látek, jejich počet se stabilizuje. Množství tumorových buněk roste exponenciálně a je omezeno jen množstvím živin a kyslíku a vysokým překryvem vytvářejícím poškození. Oscilace je způsobena jedinou mateřskou buňkou, ze které je celý tumor v iteraci 9 751 vytvořen.



Obr. 31 - Změna počtu buněk, režim p1, bodový zdroj látek

Na Obr. 32 v zobrazení závislosti poloměru na vzdálenosti je jako malý poloměr buněk blízko středu kolonie viditelná probíhající apoptóza. Z důvodu různé délky cyklu, která závisí na množství látek, se buňky nedělí zároveň, ale „ve vlnách“ – buňky vstupující do buněčného cyklu jsou vždy v přibližně stejné vzdálenosti od středu. Tento jev je patrný nejen na Obr. 30, kde se buňky dělí na okrajích tumoru i uprostřed, ale i na Obr. 32 v zobrazení poloměru, který mají dělicí se buňky větší. Uprostřed tumoru buňky do cyklu teprve vstupují a s přibývajícím vzdáleností v něm postupují dál až do dalšího dělení. Zároveň jsou tedy zobrazeny dvě generace buněk. Díky vlastní tvorbě růstových faktorů jsou rakovinné buňky větší a proliferují bez závislosti na vzdálenosti od zdroje látek. Díky tomu je i pokles jejich velikosti menší než v případě zdravých buněk.



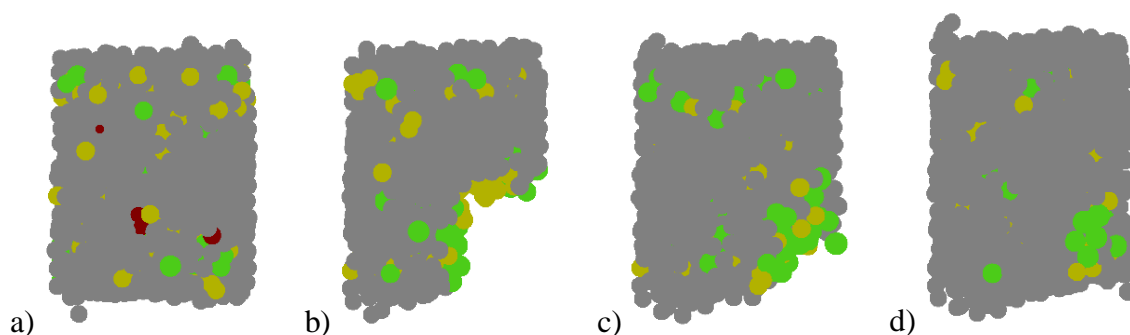
Obr. 32 - Závislost r a ρ buněk na vzdálenosti od bodového zdroje živin, režim p1

V zobrazení závislosti hustoty na vzdálenosti od středu kolonie na Obr. 32 jsou patrné tři shluky s přibližnými průměrnými hodnotami $\rho_1 = 1,05$, $\rho_2 = 0,6$ a $\rho_3 = 0,1$. Zatímco blízko středu je díky probíhající apoptóze několika buněk uvolňováno místo a překryvů je málo, od vzdálenosti 50 μm je velké množství překryvů a tedy i vysoká hustota prostředí. Je to způsobeno tím, že vlna dělicích se buněk uprostřed kolonie vytlačuje okolní buňky, které na zvýšený překryv zareagují svým pohybem směrem od středu. Tato reakce není okamžitá a závisí na velikosti konstant v rovnicích 4.14 a 4.16. Druhý shluk je tvořen buňkami tumoru ve fázi G_1 . Tyto buňky jsou mezi dvěma vlnami buněčného dělení a jsou tak stlačovány z obou stran. Protože je však celkový objem této oblasti větší než ve středu kolonie, je množství překryvů rozprostřeno mezi více buněk. Třetí shluk má nejméně překryvů a je tvořen převážně zdravými buňkami, které jsou na okraji kolonie a mají tak prostor pro pohyb ve směru nejmenší hustoty.

Simulace opravy poranění

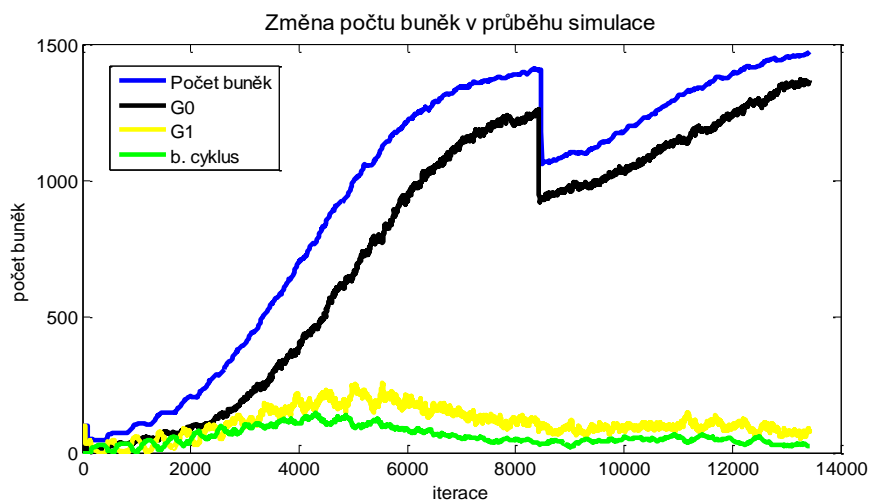
Testována je schopnost modelu napodobit opravné mechanismy živých organismů. K tomu byl využit přednastavený režim p2 se stejným nastavením, jaké bylo použito v předchozí simulaci. Protože je simulováno mechanické poškození, růst tumoru je deaktivován.

Celá simulace trvala 2 769 sekund a bylo v ní provedeno 8 476 iterací do stabilizace kolonie a 5 000 iterací po odstranění její části. Odstraněno bylo 345 z celkem 1 405 buněk, tedy přibližně čtvrtina. Postupné vyplňování vzniklého prostoru je vidět na Obr. 33. Odkrytím buněk, jejichž proliferace byla inhibována dotykem s okolními buňkami, dochází k jejich přechodu do fáze G_1 a následně i do buněčného cyklu. Takto se buňky dále dělí a jejich počet přibývá do opětovného ustálení kolonie.



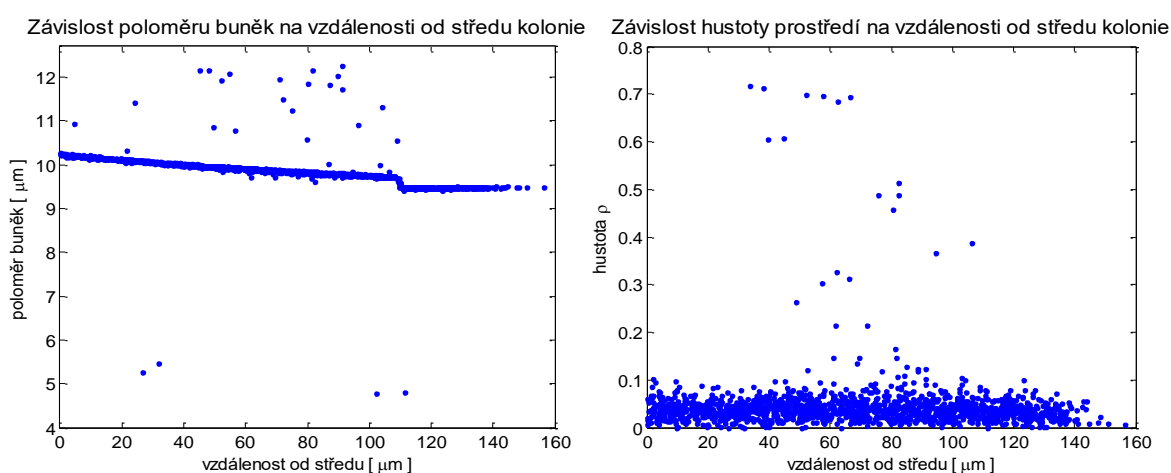
Obr. 33 - Režim p2 po a) 8 000, b) 10 000, c) 12 000 iteracích a (d) na konci simulace

Změna počtu buněk je patrná z Obr. 34, ve kterém je zobrazen vývoj množství buněk v jednotlivých fázích. Modře je zobrazen celkový počet simulovaných buněk, černě buňky ve fázi G_0 , žlutě v G_1 a zeleně buňky ve fázích S, G_2 nebo M. Dorůstání na původní počet buněk trval 3 709 iterací, což odpovídá době přibližně 10,3 dní.



Obr. 34 - Změna počtu buněk, režim p2

Na Obr. 35 jsou zobrazeny grafy velikostí buněk a odhadu hustoty prostředí v závislosti na vzdálenosti od středu kolonie – roviny s maximálním množstvím látek. Oproti simulaci růstu tumoru (Obr. 29) zde poloměr buněk mnohem méně závisí na jejich překrytí, které je jen minimální. Odchylky jsou způsobeny celkem 24 buňkami v různých fázích buněčného cyklu a 5 buňkami v apoptóze. Průměrný poloměr $9,85 \mu\text{m}$ přibližně odpovídá požadovanému poloměru $10 \mu\text{m}$. Rozdíl je způsoben malým rozměrem apoptických buněk a skokovou změnou ve vzdálenosti přibližně $110 \mu\text{m}$ od středu kolonie. Ta je způsobena přechodem buněk do fáze G_0 z důvodu podprahových množství látek nutných pro vstup do buněčného cyklu. Velikost buněk v této oblasti je tak závislá jen na množství překryvů způsobených okolními buňkami (Rovnice 4.9).



Obr. 35 - Závislost r a ρ buněk na vzdálenosti od zdroje živin, režim p_2

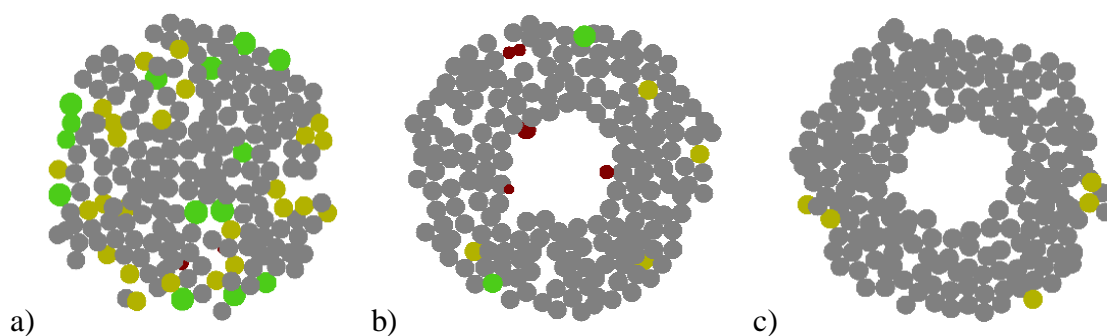
V živé tkáni dochází k opravě poranění pomocí dělení buněk, které postupně zaplňují ránu. Nejprve je však aktivací koagulačních faktorů zastaveno případné krvácení a neutrofilními granulocyty jsou odstraněny bakterie a znečištění v ráně. Dělení buněk je poté stimulováno růstovými faktory TGF- β a PDGF, které jsou uvolňované makrofágy, lymfocyty a trombocyty. Zatímco TGF- β se podílí na zvýšené proliferaci fibroblastů, které vytvářejí kolagen pro pevné spojení poraněné oblasti, PDGF je důležitý pro kontrakci rány a pro angiogenezi. Kolagenová síť následně v několika následujících dnech slouží jako podklad pro růst nových buněk. Ve druhém týdnu po zranění je vytvořena pevná jizva, která je díky vysokému obsahu kolagenu často pevnější než původní tkáň. K úplnému zahojení dochází po několika týdnech až měsících, v závislosti na velikosti poškození [76].

V porovnání s reálnými buňkami je simulovaný proces hojení velmi zjednodušený a je vhodný pouze pro simulaci oprav tkání s buňkami, které jsou schopné vrátit se z fáze G_0 zpět do buněčného cyklu – např. buňky kmenové, jaterní a endotelové [26].

Simulace tvorby dutých orgánů

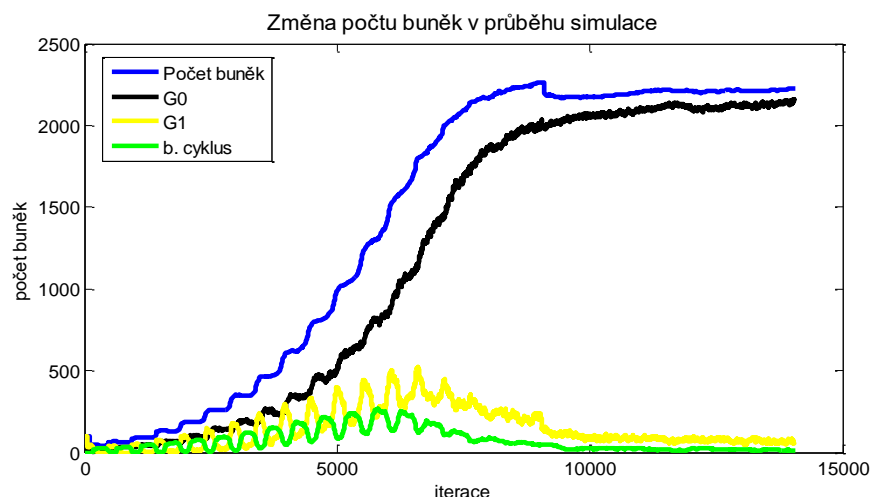
Duté orgány savců (např. kardiovaskulární systém a trávicí soustava) jsou v embryonálním vývoji vytvářeny procesem řízeného odstraňování nepotřebných buněk – apoptózou. V případě tvorby srdce, ve kterém je mnoho typů buněk a funkčních částí, je pro správný průběh vývoje nutná spolupráce a komunikace mezi mnoha apoptickými signálními drahami, včetně tumor supresorové dráhy p53 [77]. V vytvořeném modelu je apoptóza spouštěna vysokým poškozením buněk, které nastává po přidání toxinů do prostředí. Buňky uprostřed kolonie tak umírají a buňky na okraji přežijí. Takto vzniklá rovnováha mezi toxiny a živinami v simulaci je podobná rovnováze mezi látkami indukujícími apoptózu a látkami podporujícími přežití buněk v živé tkáni [73].

Pro tento test byl využit přednastavený režim p3 se standardním nastavením popsaným v testu vytvoření tumoru, jen prostorový gradient k byl změněn na hodnotu 180 pro lepší viditelnost vytvářené dutiny (Obr. 36). Celá simulace trvala 6 916 sekund, přičemž k ustálení kolonie bylo potřeba 9 054 iterací. Následně byl do středu kolonie přidán bodový zdroj toxinů s gradientem třikrát strmějším než u zdroje ostatních látek. Od množství toxinů nebyl odečten nastavitelný pokles, aby bylo jisté, že dojde k destrukci ve středu umístěných buněk. Apoptózou bylo odstraněno 73 buněk a v následujících 5 000 iteracích se už jejich celkový počet příliš nezměnil – nově rozdělené buňky vyrovnávaly počet buněk odstraněných z důvodu vysokého poškození nebo kladného vyhodnocení kontrolních bodů.



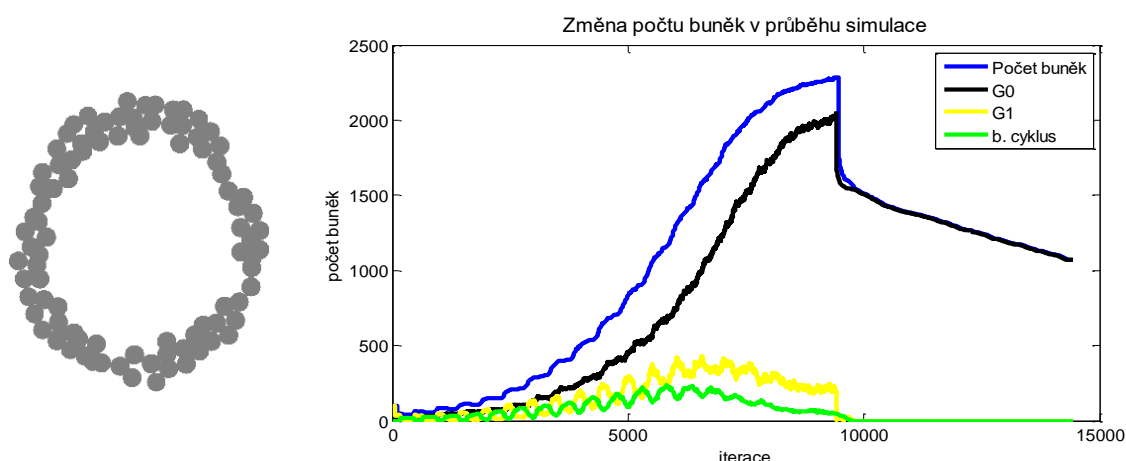
Obr. 36 - Řez kolonií v iteraci a) 7 000, b) 9 200 a c) na konci simulace

Vývoj počtu buněk v průběhu simulace je zobrazen na Obr. 37. Oscilace v počtu buněk na začátku simulace jsou způsobeny současným dělením většího počtu buněk, které mají shodné podmínky pro růst. Po stabilizaci kolonie dochází k utlumení oscilací, protože se i přes dostatek živin a růstových faktorů dělí jen ty buňky, které mají dostatek prostoru.



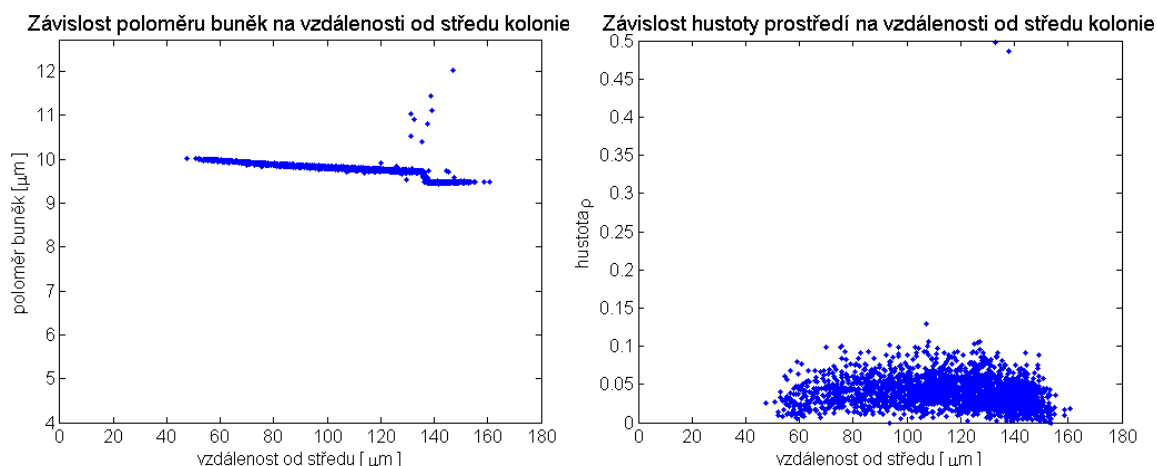
Obr. 37 - Změna počtu buněk, režim p3

Pokud by zdroj toxinů byl příliš velký, velikost kolonie by se nestabilizovala a počet buněk by se rychle snižoval, protože by nedocházelo k novým dělením (Obr. 38). V takovém případě by po delší době došlo k úplnému zničení celé kolonie.



Obr. 38 - Příliš vysoký rozsah poškození při tvorbě dutiny

V zobrazení závislosti poloměru buněk a hustoty prostředí na vzdálenosti od středu kolonie na Obr. 39 je vidět, že do vzdálenosti 46 μm od středu jsou všechny buňky odstraněny a až do 120 μm se nedělí z důvodu mírného poškození – buňky jsou v senescentní fázi G_0 . Poloměr buněk se vzdáleností z důvodu snižujícího se množství látek klesá až po 135 μm , kde je prahové množství růstových faktorů. Za touto hranicí je v modelu udržován stejný poloměr buněk $r = 9,5 \mu\text{m}$ s mírnými odchylkami kvůli překrytí (Rovnice 4.9). Větší poloměr pozorovatelný u šesti buněk za skokovou změnou velikosti je způsoben tím, že tyto buňky zahájily buněčný cyklus blíže středu a poté byly interakcí s okolními buňkami odsunuty dál. Protože je buněčný cyklus nevratný, buňky v něm pokračují i bez nadprahového množství růstových faktorů.



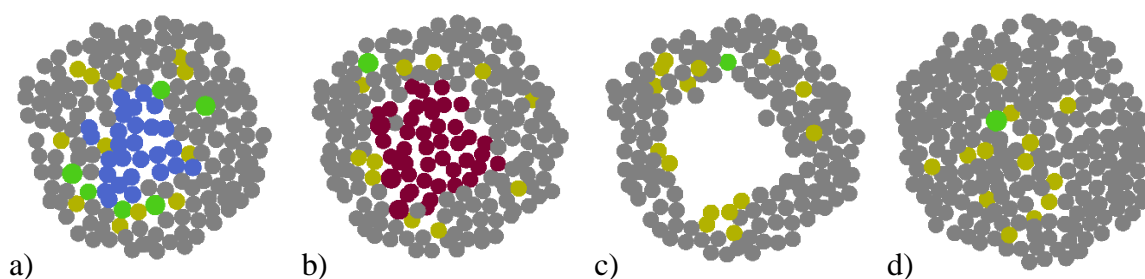
Obr. 39 - Závislost r a ρ buněk na vzdálenosti od zdroje živin, režim p3

Zvýšený překryv u dvou buněk viditelný v zobrazení závislosti hustoty na vzdálenosti od středu na Obr. 39 je dán tím, že tyto dvě buňky se právě rozdělily a ještě nebyla provedena jejich kompletní separace. Pozice ostatních buněk odpovídá rozptýlení látek – blíže ke středu je z důvodu přítomných toxinů buněk méně, a proto je i jejich hustota menší. Ve velké vzdálenosti se pak buňky nedělí kvůli nedostatku růstových faktorů.

Simulace genové terapie

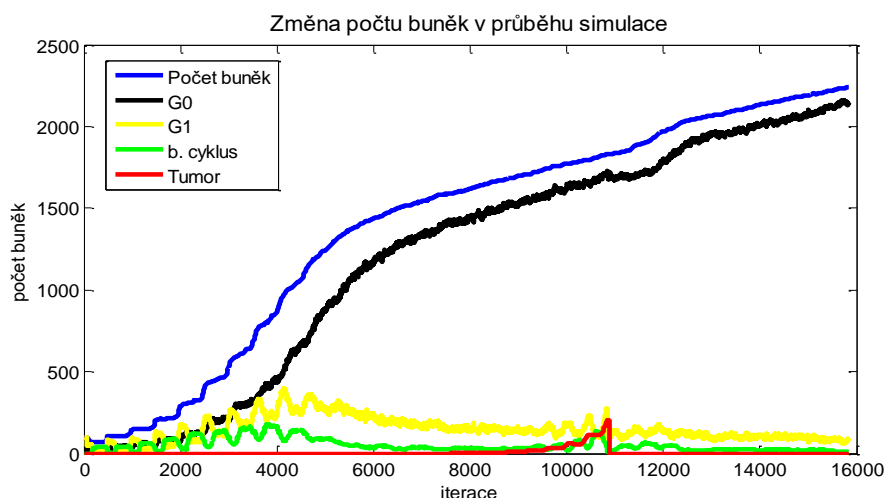
Testována je schopnost modelu simulovat léčbu nádorového onemocnění pomocí reaktivace tumor supresorové signální dráhy. Mutace v genu kódujícím protein p53 často bývá příčinou nezastavitelného dělení rakovinných buněk. V klinických testech proto bývá testována opětovná reaktivace p53 pomocí cílených léčiv, které se soustředí pouze na tumor a zdravé buňky tak oproti klasickým přístupům (radioterapie, chemoterapie) nepoškozují. Opětovnou aktivací tumor supresorové signální dráhy dochází k zamezení dalšímu dělení rakovinných buněk nebo přímo k jejich zničení přirozeným procesem apoptózy [74].

Simulace byla provedena se standardním nastavením pro $k = 150$. Celkem bylo za 7 082 sekund provedeno 15 840 iterací, z toho 7 593 pro ustálení, 3 247 pro růst tumoru a 5 000 po aktivaci tumor supresorů. Průběh simulace je znázorněn na Obr. 40.



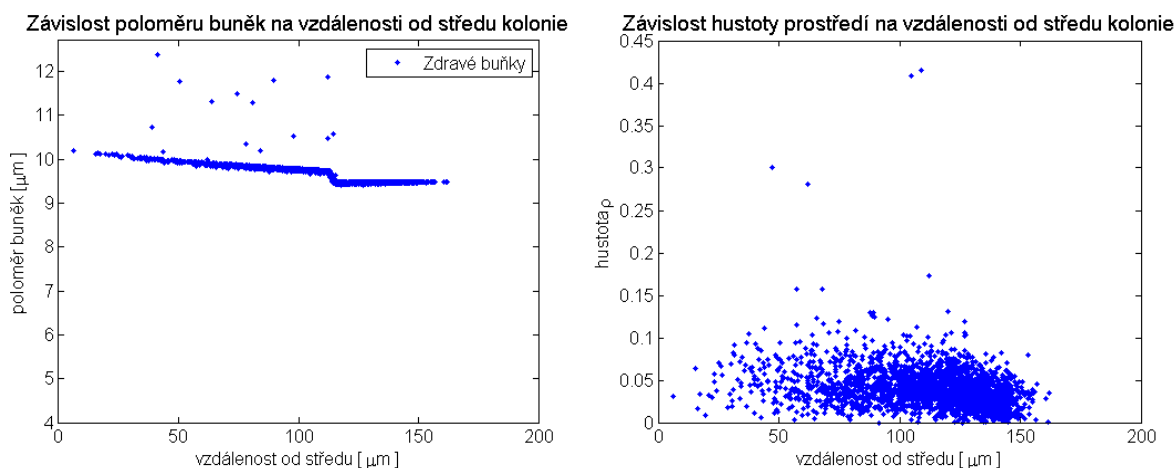
Obr. 40 - Režim p4: a) před a b) po reaktivaci, c) odstranění tumoru, d) vyplnění

Princip vyplňování dutiny vzniklé po odstranění tumoru je stejný jako při opravě poškození. Proliferace buněk není inhibována dotykem s okolními buňkami a díky poloze blízko zdroje živin a růstových faktorů je prostor rychle zaplněn. Vývoj počtu buněk je zobrazený na Obr. 41 – počet zdravých buněk je označen modrou barvou a tumor červenou. Vykresleny jsou i počty všech buněk v různých fázích. Vidět je počátek exponenciálního zvětšování počtu buněk tumoru i jejich rychlé odstranění po aktivaci tumor supresorů, které ihned způsobí apoptózu nádoru. Následně dochází k pomalé stabilizaci kolonie, při které jsou buňky blízko zdroje růstových faktorů inhibovány dotykem a vzdálené buňky nemají dostatek látek potřebných pro dělení.



Obr. 41 - Změna počtu buněk, režim p4

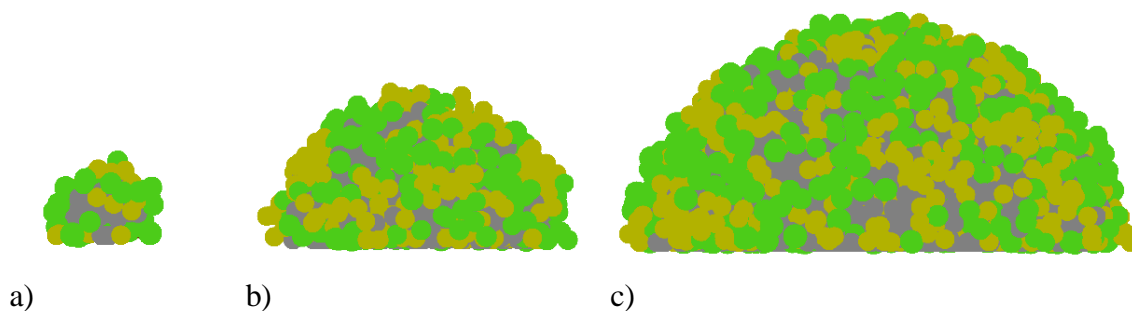
V zobrazení závislostí r a ρ na vzdálenostech od zdroje látek na Obr. 42 není patrné žádné nestandardní chování buněk. Velikost buněk se s ubývajícím množstvím látek zmenšuje až po dosažení podprahové úrovně růstových faktorů, při které je velikost konstantní. Vyšší hustota je způsobena dělicími se buňkami, které mají větší překryv.



Obr. 42 - Závislost r a ρ buněk na vzdálenosti od zdroje živin, režim p4

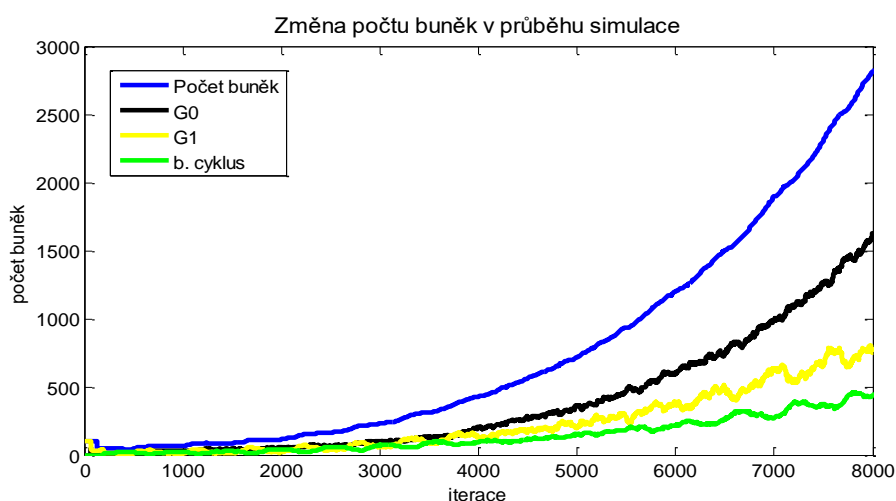
Simulace růstu buněk na pevném povrchu

Tímto testem byla ověřena schopnost modelu simulovat růst buněk na pevné podložce, kterou může být *in vitro* např. Petriho miska a *in vivo* např. kost. Protože je nastaven plošný model rozprostření látek v prostoru s parametrem $k = 200$ bez lineárního poklesu, je v tomto případě simulován růst buněk v Petriho misce s látkami dodávanými z podloží (např. z agarózového gelu). Program byl spuštěn s parametry `bunky 8000 3 0 1 n`, které určují počet iterací 8 000, časové měřítko 3x, žádné prostorové omezení a žádný tumor. Pevná podložka byla povolena v souboru `config.ini`.



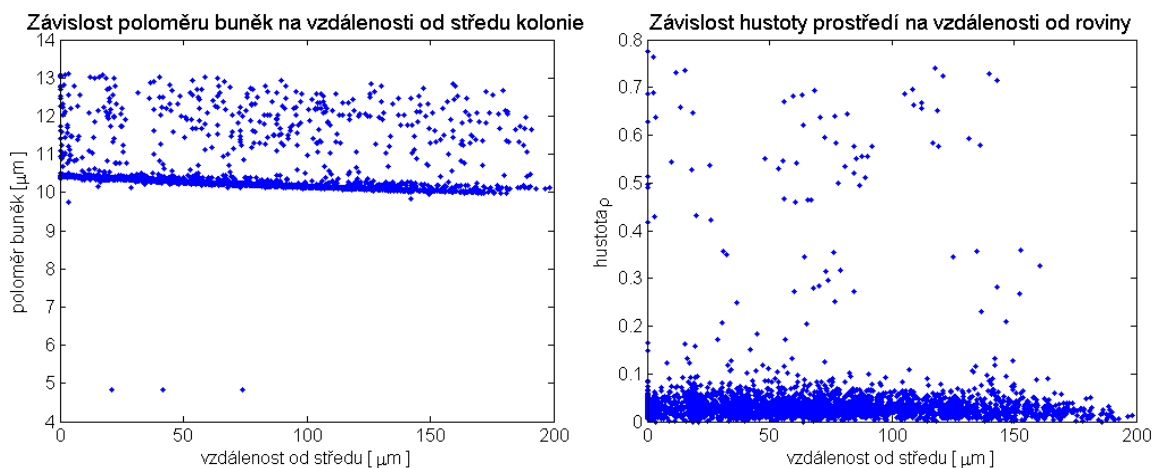
Obr. 43 - Růst buněk na pevném povrchu: iterace 2 000 (a), 6 000 (b) a 8 000 (c)

Výsledek simulace je na Obr. 43, kde je zobrazena kolonie buněk ve vybraných iteracích. Výpočet trval 1 675 sekund reálného času a 16,7 dní v simulaci. Za tuto dobu vzrostl počet buněk ze 100 na 2 821. Množství buněk v jednotlivých fázích je vykresleno na Obr. 44. Protože není simulovaný prostor nijak omezen, je patrný exponenciální nárůst všech zaznamenaných stavů buněk. Opět je zde u stavů G_1 a buněčného cyklu viditelná oscilace způsobená současným dělením většího počtu buněk.



Obr. 44 - Změna počtu buněk, růst na pevné podložce

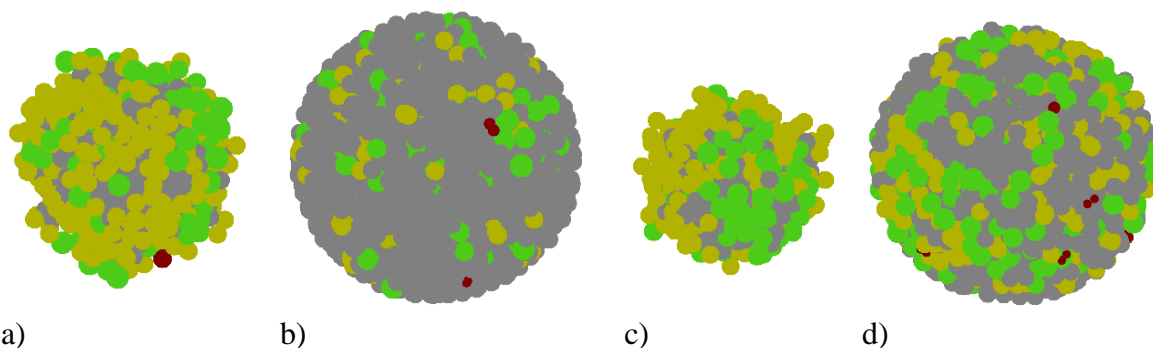
V zobrazení závislosti poloměru a hustoty na vzdálenosti od pevného povrchu na Obr. 45 je vidět, že k proliferaci buněk dochází díky pomalému poklesu množství látek v celém objemu kolonie. Vyšší překryvy jsou způsobeny právě těmito dělicími se buňkami.



Obr. 45 - Závislost r a ρ buněk na vzdálenosti od zdroje živin, růst na rovině

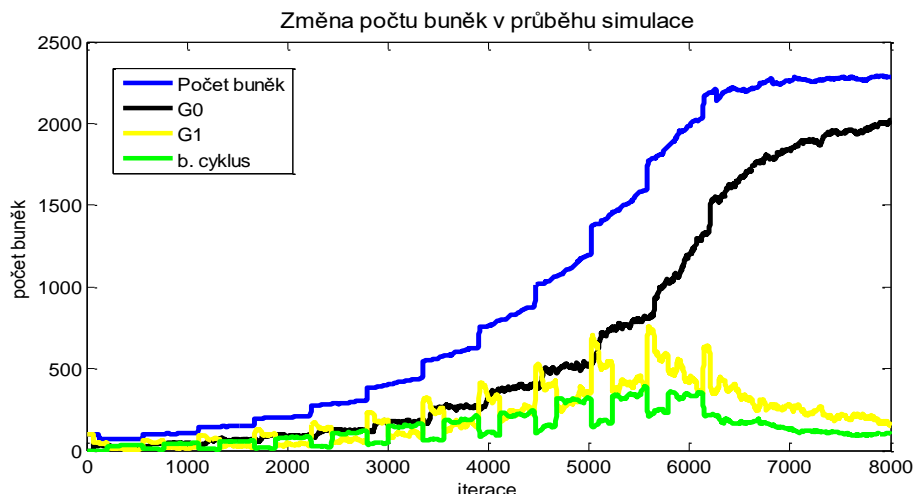
Simulace růstu tkáně

V živé tkáni je díky difuzi z husté sítě vlásečnic velmi dobré rozprostření živin, které je v modelu aproximováno konstantním množstvím látek (ideální model) nebo modelem cévy. Simulace byla provedena pro oba uvedené modely s výsledky na Obr. 46. Simulovaný prostor byl omezen do vzdálenosti 150 μm a bylo provedeno 8 000 iterací s časovým měřítkem 3x. Nastaveno bylo $k = 200$ a lineární pokles 0,2. Díky tomu byl i na okraji omezeného prostoru dostatek růstových faktorů a jediným omezením proliferace tak zůstala inhibice dotyky s okolními buňkami. Projevil se však pokles množství látek ve větší vzdálenosti u modelu cévy, která je na Obr. 46d patrná jako menší velikost kolonie oproti kolonii s modelem ideálním. Je to způsobeno pomalejším metabolismem (viz Rovnice 4.7) kvůli kterému je celková velikost buněk menší.

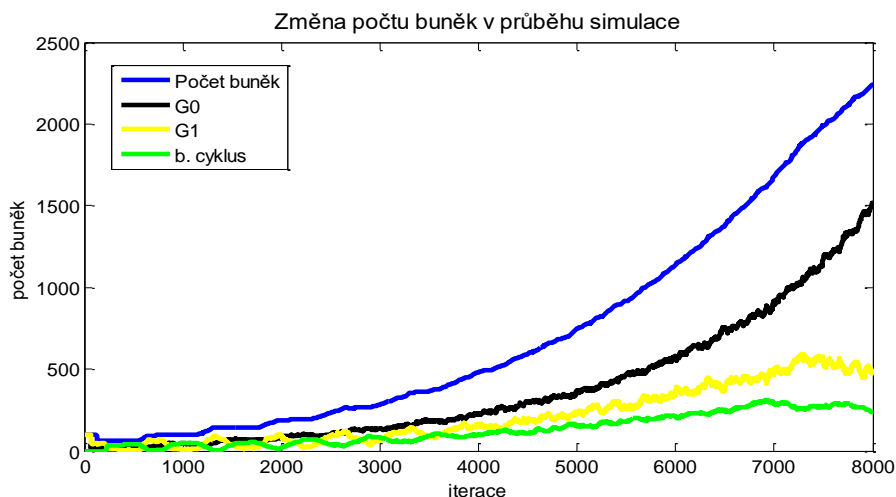


Obr. 46 - Iterace 4 000 a 8 000 pro model ideální (a, b) a pro cévu (c, d)

Počet buněk na koncích simulací je přitom téměř stejný – 2 288 pro ideální model a 2 241 pro cévu. Jak je vidět na Obr. 47 a Obr. 48, v ideálním modelu bylo dělení buněk díky rychlejšímu metabolismu mnohem rychlejší, ale díky ustálení a přechodu většiny buněk do fáze G_0 se již kolonie stabilizovala. Pro model cévy by bylo nutné pro dosažení stabilizace provést delší simulaci. Pozorovatelné skoky v počtu dělících se buněk jsou opět způsobeny malým počtem mateřských buněk a stejnou délkou cyklu bez závislosti na vzdálenosti od středu kolonie.



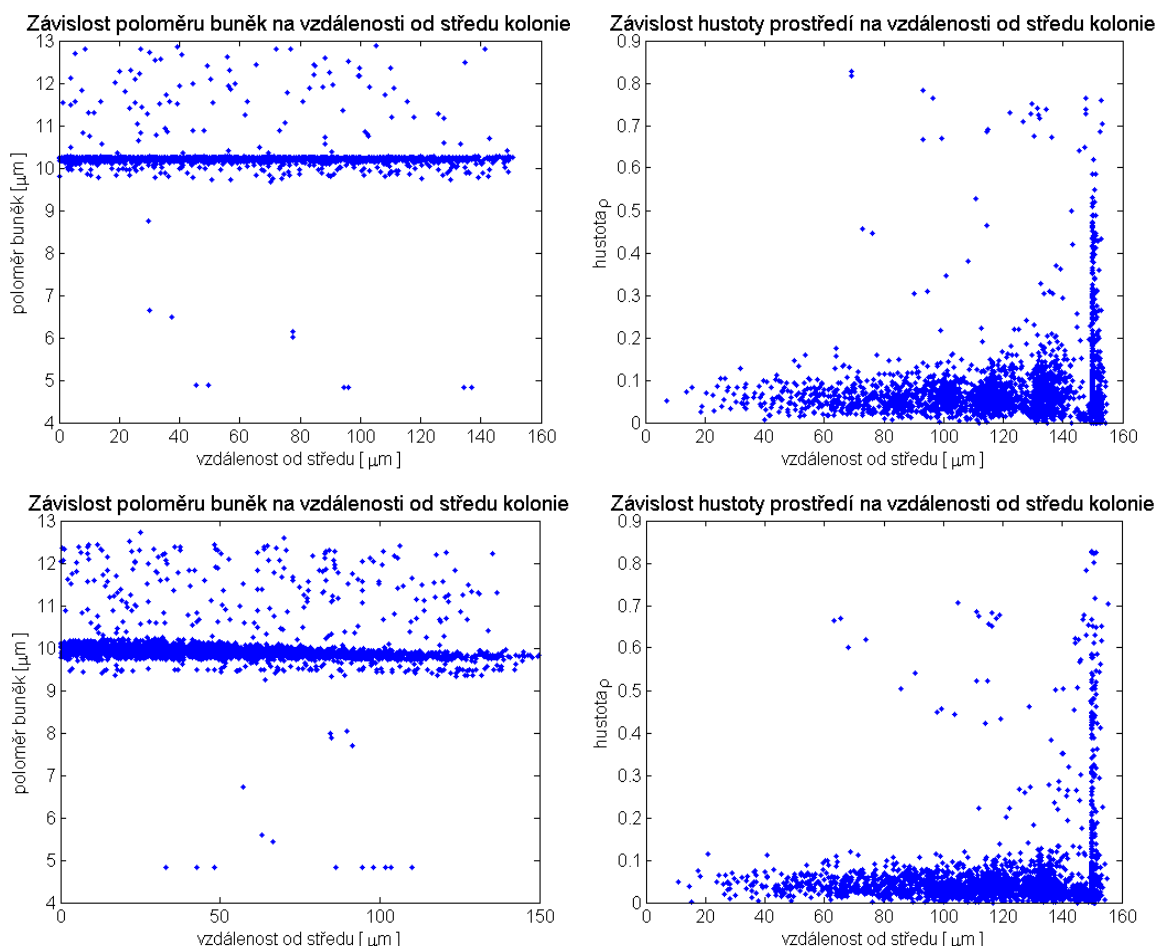
Obr. 47 - Změna počtu buněk, růst tkáně s ideálním modelem



Obr. 48 - Změna počtu buněk, růst tkáně s modelem cévy

Jak je vidět na souhrnném zobrazení závislostí poloměru buněk a hustoty prostředí na vzdálenosti od středu obou simulovaných kolonií (Obr. 49), poloměr buněk je v ideálním prostředí v každé vzdálenosti přibližně stejný. Odchyly od průměru 10,24 μm jsou způsobeny přizpůsobením buněk svému okolí, buněčným cyklem a apoptózou. U modelu cévy je naopak vidět mírný pokles způsobený ubývajícím množstvím živin, kyslíku a růstových faktorů. V závislostech hustoty na vzdálenosti jsou v obou případech vidět shluky

buněk způsobené oscilacemi v pohybu – v jedné iteraci se buňky pohybují k sobě, v další se kvůli překryvu pohybují směrem od sebe. Na okraji prostorového omezení jsou tyto oscilace nejvýraznější, protože buňky na hranici se nepohybují. Tento jev se díky pružnosti, která není do modelu implementována, u reálných buněk nevyskytuje.



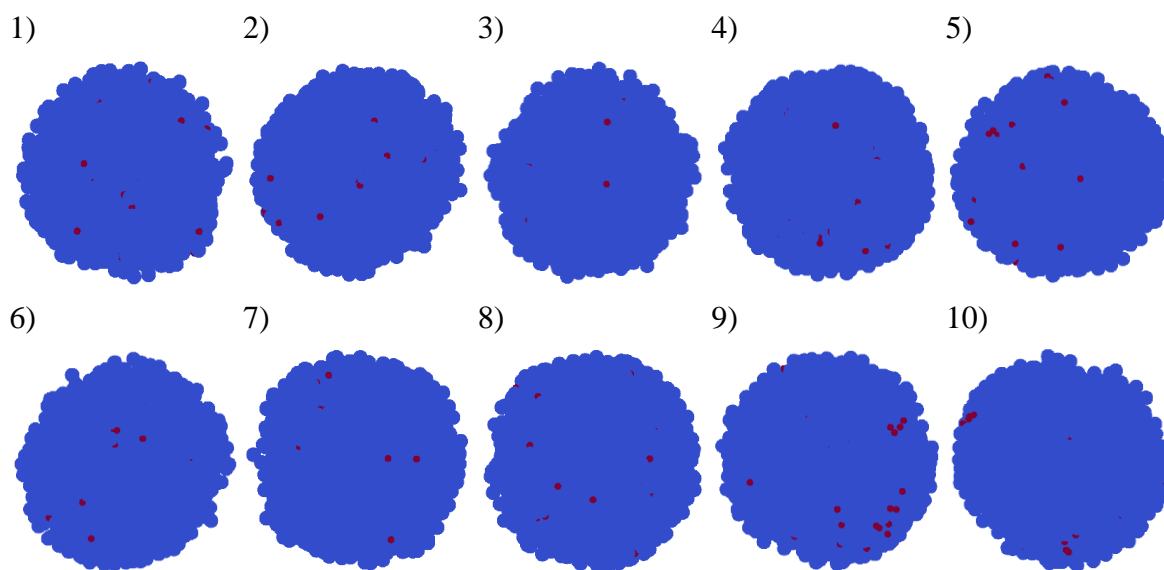
Obr. 49 - Závislost r a ρ na vzdálenosti pro model ideální (nahore) a pro cévu (dole)

V zobrazení hustoty na Obr. 49 je vidět, že některé buňky jsou umístěny i za prostorovým omezením. Je to způsobeno náhodným generováním polohy nově rozdělených buněk, jejichž souřadnice vycházejí z pozice středu mateřské buňky. K původním souřadnicím x , y a z jsou přičteny náhodné hodnoty z intervalu $\langle -2,5, 2,5 \rangle$, které určují prvotní směr dělení nově vzniklých buněk. Největší možný přesah přes prostorové omezení je tak při libovolně nastavené vzdálenosti hranice přibližně 4,3 μm.

Simulace kolonie buněk HeLa

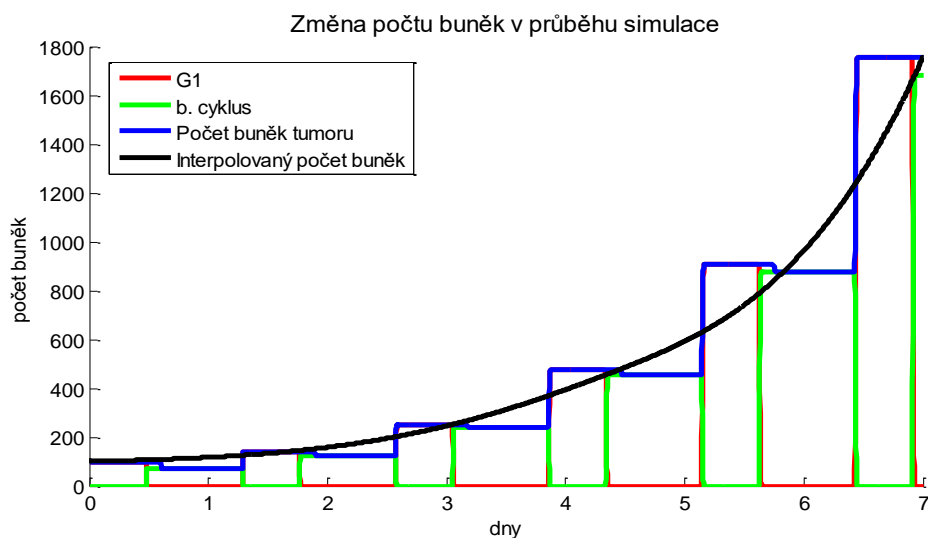
Pro otestování validity navrženého modelu byla provedena simulace rakovinných buněk HeLa, které jsou díky neomezenému dělení a snadné kultivaci jednou z nejpoužívanějších linií ve výzkumu tumorů i jiných lidských onemocnění.

Buňky HeLa mají poloměr 10 μm a délku cyklu 24 hodin [78], nejsou inhibovány kontaktem se sousedními buňkami [79] a mají deaktivované tumor supresorové dráhy. Práh apoptózy byl ponechán na hodnotě $5 \cdot 10^{-3}$, která vyvolává apoptózu u přibližně 2 % buněk [69]. Byl zvolen ideální prostorový model s konstantním množstvím látek 50 % a omezením do vzdálenosti 150 μm . Délka simulace byla zvolena na dobu 7 dní (5 040 iterací s časovým měřítkem 2), přičemž prvotní náhodně generovanou kolonii 100 buněk tvořily pouze buňky HeLa. Další nastavení nebylo měněno. Simulace růstu kolonie byla provedena 10x pro zhodnocení opakovatelnosti. Výsledky, které jsou zobrazeny na Obr. 50, jsou z důvodu použití náhodně určených směrů dělení buněk vždy jiné. Zachován je však celkový tvar kolonie, který je dán použitým modelem pohybu buněk a aproximací adheze buněčných membrán.



Obr. 50 - Výsledek deseti simulací kolonie buněk HeLa

Na Obr. 51 je zobrazený průměr počtu buněk v průběhu všech simulací. Protože je množství látek v prostoru konstantní, má i úroveň metabolismu všech buněk v každé simulaci stejnou hodnotu 0,677. Buňky se proto dělí stejnou rychlostí a ve stejnou dobu bez závislosti na umístění v kolonii. Tento jev je v grafu patrný jako skokové přechody mezi fázemi G_1 a buněčným cyklem s následným dělením nových buněk. Mírný pokles počtu buněk po vstupu do buněčného cyklu je způsoben vyšším tlakem na rostoucí buňky a více překryvy způsobujícími poškození. Buňky s největším poškozením poté apoptózou uvolňují místo novým buňkám.



Obr. 51 - Průměrný vývoj počtu buněk ve všech provedených simulacích

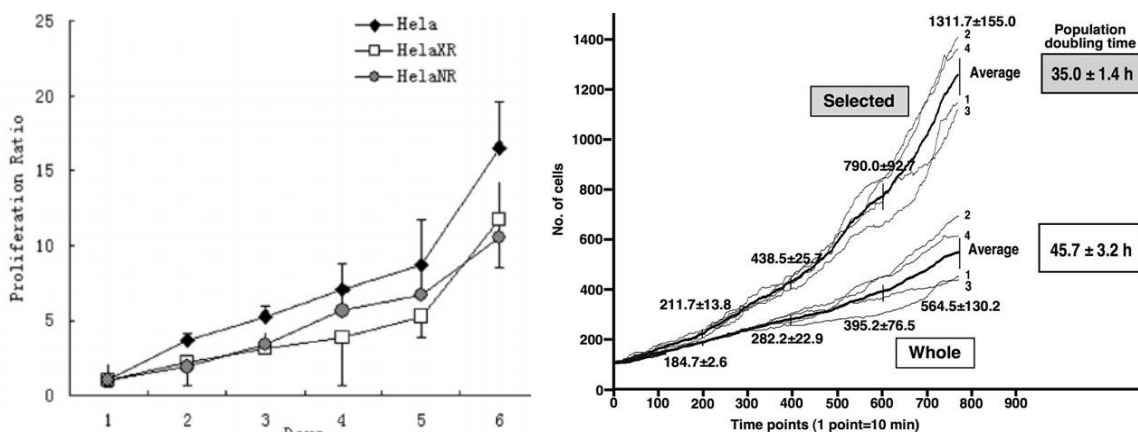
Z každé simulace, trvající v průměru 477 sekund, byl získán konečný počet buněk, jejich celkový objem, průměrný poloměr a aproximovaná hustota daná překryvem (viz Tabulka 1). Z těchto údajů byly následně vypočteny průměrné hodnoty a výběrové směrodatné odchylky.

Tabulka 1 - Výsledek simulací kolonií buněk HeLa

Simulace	Počet buněk HeLa	Objem tumoru [mm ³]	Průměrný poloměr [μm]	Průměrná hustota
1	1 598	$7,1 \cdot 10^{-3}$	10,07	0,043
2	1 676	$7,5 \cdot 10^{-3}$	10,13	0,044
3	1 630	$7,3 \cdot 10^{-3}$	10,15	0,041
4	1 874	$8,4 \cdot 10^{-3}$	10,13	0,054
5	1 896	$8,5 \cdot 10^{-3}$	10,10	0,059
6	1 692	$7,6 \cdot 10^{-3}$	10,15	0,047
7	1 666	$7,5 \cdot 10^{-3}$	10,15	0,042
8	1 780	$8,0 \cdot 10^{-3}$	10,13	0,047
9	1 926	$8,5 \cdot 10^{-3}$	10,07	0,056
10	1 820	$8,2 \cdot 10^{-3}$	10,16	0,050
\bar{x}	1755,8	$7,86 \cdot 10^{-3}$	10,124	0,0483
σ_{n-1}	118,6	$5,23 \cdot 10^{-4}$	0,033	0,0063

Výsledky v Tabulce 1 ukazují, že zatímco poloměr buněk se téměř nemění, jejich počet, objem tumoru a hustota mají v porovnání s průměrnými hodnotami poměrně velkou směrodatnou odchylku. Pozorovat lze také vzájemné závislosti mezi objemem tumoru a hustotou – čím více buněk je v omezeném prostoru, tím více se překrývají.

Rozdíl v konečném počtu buněk je způsoben náhodně generovaným poškozením buněk na počátku simulace, jehož cílem je napodobit zakládání kolonií živých buněk. Při manipulaci s buňkami a jejich nanášení na médium může docházet k jejich poškození a než se přizpůsobí novému prostředí, může dojít k dočasnému snížení jejich počtu (tzv. lag fáze). U nadměrně poškozených buněk poté dochází k apoptóze. Vzhledem k náhodně generovaným hodnotám poškození a směru dělení buněk nelze navržený model pokládat za deterministický a při vyhodnocování výsledků a srovnávání s jinými modely nebo reálnými buňkami je nutné tyto nepřesnosti zohlednit a provést více simulací pro dosažení odpovídajícího výsledku. Srovnávat lze však kvalitativní parametry, např. vývoj počtu buněk. Na Obr. 52 jsou zobrazeny průběhy růstu buněk HeLa ve dvou různých experimentech. Viditelný je, stejně jako na Obr. 51, exponenciální nárůst počtu buněk, které však byly v obou případech v různém prostředí a měly tak různě dlouhý buněčný cyklus.



Obr. 52 - Srovnání rychlosti růstu buněk HeLa, převzato z [69] (vlevo) a [80]

Také při výzkumu kolonií živých buněk dochází k různým chybám – i když je možné sledovat počet buněk a délku jejich buněčného cyklu, nelze současně bez zničení těchto buněk spolehlivě měřit aktivitu intracelulárních signálních drah ani aktuální expresi genů. Pro tato měření se část kolonie odděluje a pomocí různých metod (hmotnostní spektrometrie, western blot apod.) se získávají potřebné informace o množství proteinů. Protože je však měřen jen vzorek z celé kolonie, nemusí přesně odpovídat aktivitě každé buňky. Stejně tak je pro analýzu růstu tumorů v živé tkáni potřeba znát přesnou strukturu tkáně a ECM včetně polohy veškerých buněk a velikosti adheze mezi nimi. Se současnou technologií tato měření nejsou možná a veškeré dostupné modely jsou tak pouze idealizované, bez přizpůsobení parametrů konkrétním pacientům a mutacím, které tvoří různé typy rakoviny.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá modelováním kolonie lidských buněk, jejíž řízení je založeno na buněčném cyklu a na principech intracelulárních signálních drah. Podrobně byly vysvětleny jednotlivé fáze buněčného cyklu včetně principu kontrolních bodů, které zamezují vzniku mutací. Dále byly popsány signální dráhy MAPK, doplňující se kombinace drah Hippo a PI3K/TOR regulující velikost a počet buněk ve tkáni a dráhy PI3K/Akt s HIF1 ovlivňující metabolismus buněk. Vysvětlen je také proces apoptózy, tumorigeneze založená na mutacích v signálních drahách a intercelulární dynamika, zajišťující vzájemné interakce a adhezi membrán buněk v kolonii. Protože je možné všechny tyto procesy simulovat výpočetní technikou *in silico*, je v práci obsažen popis nejpoužívanějších technik, které se v systémové biologii používají pro simulaci interakcí proteinů, intracelulárních procesů i celých buněk.

Praktickou část práce tvoří návrh vlastního modelu dynamiky buněčné kolonie, který je založen na buněčném cyklu a popsáných principech signálních drah. Nastavení parametrů modelu lze měnit v automaticky vytvářeném souboru a lze tak simulovat proliferaci různých typů buněk, včetně rakovinných. Pro zobrazování simulované kolonie byl v programu Microsoft Visual Studio v jazyce C++ s využitím knihovny SFML vytvořen jednoduchý nástroj, které lze spouštět na libovolném počítači se systémem Windows. Pomocí tohoto nástroje byl model otestován pro různá nastavení.

Simulace byly provedeny pro růst zdravých i rakovinných buněk, mutaci buňky ve zdravé tkáni a následný vznik tumoru, pro opravné procesy spouštěné po poranění, vývoj dutých orgánů v embryogenezi a pro kultivaci buněk na Petriho misce. Simulována byla i onkologická léčba cílenými léčivými reaktivujícími tumor-supresorový protein p53. Pro všechny provedené simulace byly výsledky podrobně popsány a vysvětleny. Dílčí výsledky pro signální dráhu HIF1 a intercelulární dynamiku buněk byly srovnány s podobnými modely. Výsledky provedených simulací byly porovnány také s reálnými buňkami, přičemž ve všech případech se, i přes značná zjednodušení modelu, chování modelových buněk blížilo chování buněk živých. Vytvořený model je tak možné využít pro simulaci různých buněčných procesů.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LODISH, H.F. *Molecular cell biology: Overview of the Cell Cycle and Its Control*. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2000. ISBN 07-167-3136-3.
- [2] SATYANARAYANA, A. a KALDIS, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk's, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*. 2009, **28**(33), 2925-2939. DOI: 10.1038/onc.2009.170.
- [3] WOO, R.A. a RANDY Y.C. POON. Cyclin-Dependent Kinases and S Phase Control in Mammalian Cells. *Cell Cycle*. 2014, **2**(4), 315-323. DOI: 10.4161/cc.2.4.468.
- [4] O'CONNOR, C.M. a ADAMS, J.U. *Essentials of Cell Biology* [online]. Cambridge, MA: NPG Education, 2010 [cit. 2016-08-04]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010>
- [5] Cell cycle - Homo sapiens (human). *KEGG PATHWAY* [online]. 2016 [cit. 2016-10-04]. Dostupné z: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04110.
- [6] COOPER, G.M. *The cell: a molecular approach*. 2nd ed. Washington (DC): ASM Press, 2000. ISBN 08-789-3106-6.
- [7] KURZ, E.U. a LEES-MILLER, S.P. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair*. 2004, **3**(8-9), 889-900. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.03.029.
- [8] GORBSKY, G.J. The mitotic spindle checkpoint. *Current Biology*. 2001, **11**(24), R1001-R1004. DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00609-1.
- [9] DEMARIA, M., OHTANI, N., YOUSSEF, S.A., et al. An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*. 2014, **31**(6), 722-733. DOI: 10.1016/j.devcel.2014.11.012.
- [10] AGARWAL, M.L., AGARWAL, A., TAYLOR, W.R. a STARK, G.R. P53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(18), 8493–8497.
- [11] ILIAKIS, G., WANG, Y., GUAN, J. a WANG, H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*. 2003-9-1, **22**(37), 5834-5847. DOI: 10.1038/sj.onc.1206682.

- [12] DENICOURT, C. Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes*. 2004, **18**(8), 851-855. DOI: 10.1101/gad.1205304.
- [13] GUO, H., TIAN, T., NAN, K. a WANG, W. P57: A multifunctional protein in cancer (Review). *International Journal of Oncology*. 2010, **36**(6), 1321-1329. DOI: 10.3892/ijo_00000617.
- [14] KITANO, H. (ed.). *Foundations of systems biology*. London: MIT Press, 2001. ISBN 02-621-1266-3.
- [15] SHAHZAD, K. a LOOR, J.J. Application of Top-Down and Bottom-up Systems Approaches in Ruminant Physiology and Metabolism. *Current Genomics*. 2012, **13**(5), 379-394. DOI: 10.2174/138920212801619269.
- [16] DAVIDOV, E.J., HOLLAND, J.M., MARPLE, E.W. a NAYLOR, S. Advancing drug discovery through systems biology. *Drug Discovery Today*. 2003, **8**(4), 175-183. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02600-X.
- [17] LODISH, H.F. *Molecular cell biology: Second Messengers*. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2000. ISBN 07-167-3136-3.
- [18] WARD, P.S. a THOMPSON C.B. Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012, **4**(7). DOI: 10.1101/cshperspect.a006783.
- [19] DEBERARDINIS, R.J., LUM, J.J., HATZIVASSILIOU, G. a THOMPSON, C.B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*. 2008, **7**(1), 11-20. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.10.002.
- [20] METALLO, C.M. a VANDER HEIDEN, M.G. Metabolism strikes back: metabolic flux regulates cell signaling. *Genes*. 2010, **24**(24), 2717-2722. DOI: 10.1101/gad.2010510.
- [21] ZHANG, W. a LIU, H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. 2002, **12**(1), 9-18. DOI: 10.1038/sj.cr.7290105.
- [22] MCCAIN, J. The MAPK (ERK) Pathway. *Pharmacy and Therapeutics*. 2013, **38**(2), 96-108.
- [23] DHANASEKARAN, D.N. a REDDY, E.P. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*. 2008, **27**(48), 6245-6251. DOI: 10.1038/onc.2008.301.

- [24] DHILLON, A.S., HAGAN, S., RATH, O. a KOLCH, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007, **26**(22), 3279-3290. DOI: 10.1038/sj.onc.1210421.
- [25] HANAHAN, D. a WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000, **100**(1), 57-70. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [26] LLOYD, A.C. The Regulation of Cell Size. *Cell*. 2013, **154**(6), 1194-1205. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.053.
- [27] MENG, Z., MOROISHI, T. a GUAN, K.L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes*. 2016, **30**(1), 1-17. DOI: 10.1101/gad.274027.115.
- [28] TUMANENG, K., RUSSELL R.C. a GUAN, K.L. Organ Size Control by Hippo and TOR Pathways. *Current Biology*. 2012, **22**(9), R368-R379. DOI: 10.1016/j.cub.2012.03.003.
- [29] INGBER, D.E., PRUSTY, D., SUN, Z., BETENSKY, H. a WANG, N. Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis. *Journal of Biomechanics*. 1995, **28**(12), 1471-1484. DOI: 10.1016/0021-9290(95)00095-X.
- [30] ZLOTEK-ZLOTKIEWICZ, E., MONNIER, S., CAPPELLO, G., LE BERRE, M. a PIEL, M. Optical volume and mass measurements show that mammalian cells swell during mitosis. *The Journal of Cell Biology*. 2015, **211**(4), 765-774. DOI: 10.1083/jcb.201505056.
- [31] ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007, **35**(4), 495-516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
- [32] LUM, J.J., BAUER, D.E., KONG, M., HARRIS, M.H., LI, C., LINDSTEN, T. a THOMPSON, C.B. Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell*. 2005, **120**(2), 237-248. DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.046.
- [33] ODA, K., MATSUOKA, Y., FUNAHASHI, A. a KITANO, H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular Systems Biology*. 2005-5-25, **1**(1), E1-E17. DOI: 10.1038/msb4100014.
- [34] LEE, K., SILVA, E.A. a MOONEY, D.J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of The Royal Society Interface*. 2010, **8**(55), 153-170. DOI: 10.1098/rsif.2010.0223.
- [35] ALI, O.A., HUEBSCH, N., CAO, L., DRANOFF, G. a MOONEY, D.J. Infection-mimicking materials to program dendritic cells in situ. *Nature Materials*. 2009-1-11, **8**(2), 151-158. DOI: 10.1038/nmat2357

- [36] BRILL, A., TORCHINSKY, A., CARP, H. a TODER, V. The Role of Apoptosis in Normal and Abnormal Embryonic Development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1999, **16**(10), 512-519. DOI: 10.1023/A:1020541019347.
- [37] KITTNAR, O. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [38] DVORAK, H.F., BROWN, L.F., DETMAR, M. a DVORAK, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American Journal of Pathology*. 1995, **146**(5), 1029–1039.
- [39] ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell: General Principles of Cell Communication*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 08-153-3218-1.
- [40] DAVIS, D.M. Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nature Reviews Immunology*. 2007-2-9, **7**(3), 238-243. DOI: 10.1038/nri2020.
- [41] GUMBINER, B.M. Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell*. 1996, **84**(3), 345-357. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81279-9.
- [42] MITCHISON, T.J. a CRAMER, L.P. Actin-Based Cell Motility and Cell Locomotion. *Cell*. 1996, **84**(3), 371-379. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81281-7.
- [43] STOLARSKA, M.A., KIM, Y. a OTHMER, H.G. Multi-scale models of cell and tissue dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2009, **367**(1902), 3525-3553. DOI: 10.1098/rsta.2009.0095.
- [44] LO, C.M., WANG, H.B., DEMBO, M. a WANG, Y.. Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. *Biophysical Journal*. 2000, **79**(1), 144-152. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76279-5.
- [45] FRIEDL, P. a GILMOUR, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, **10**(7), 445-457. DOI: 10.1038/nrm2720.
- [46] WACLAW, B., BOZIC, I., PITTMAN, M.E., HRUBAN, R.H., VOGELSTEIN, B. a NOWAK, M.A. A spatial model predicts that dispersal and cell turnover limit intratumour heterogeneity. *Nature*. 2015-8-26, **525**(7568), 261-264. DOI: 10.1038/nature14971.

- [47] CYTOWSKI, M. a SZYMANSKA, Z. Large-Scale Parallel Simulations of 3D Cell Colony Dynamics. *Computing in Science*. 2014, **16**(5), 86-95. DOI: 10.1109/MCSE.2014.2.
- [48] KHOLODENKO, B.N. Cell-signalling dynamics in time and space. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006-2-15, **7**(3), 165-176. DOI: 10.1038/nrm1838.
- [49] KLIPP, E. a LIEBERMEISTER, W. Mathematical modeling of intracellular signaling pathways. *BMC Neuroscience*. 2006, **7**(Suppl 1), S10. DOI: 10.1186/1471-2202-7-S1-S10.
- [50] FAURÉ, A. a THIEFFRY, D. Logical modelling of cell cycle control in eukaryotes: a comparative study. *Molecular BioSystems*. 2009, **5**(12), 1569-1581. DOI: 10.1039/b907562n.
- [51] DADA, J.O. a MENDES, P. Multi-scale modelling and simulation in systems biology. *Integrative Biology*. 2011, **3**(2), 86-96. DOI: 10.1039/c0ib00075b.
- [52] JIANG, Y., PJESIVAC-GRBOVIC, J., CANTRELL, C. a FREYER, J.P. A Multiscale Model for Avascular Tumor Growth. *Biophysical Journal*. 2005, **89**(6), 3884-3894. DOI: 10.1529/biophysj.105.060640.
- [53] MOGILNER, A., WOLLMAN, R. a MARSHALL, W.F. Quantitative Modeling in Cell Biology: What Is It Good for? *Developmental Cell*. 2006, **11**(3), 279-287. DOI: 10.1016/j.devcel.2006.08.004.
- [54] BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L. a STRYER, L. *Biochemistry: The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes*. 5th ed. New York: W.H. Freeman, 2002. ISBN 07-167-3051-0.
- [55] LOK, L. a BRENT, R. Automatic generation of cellular reaction networks with Molecuizer 1.0. *Nature Biotechnology*. 2005, **23**(1), 131-136. DOI: 10.1038/nbt1054.
- [56] CONZELMANN, H., SAEZ-RODRIGUEZ, J., SAUTER, T., KHOLODENKO, B.N. a GILLES, E.D. A domain-oriented approach to the reduction of combinatorial complexity in signal transduction networks. *BMC Bioinformatics*. 2006, **7**(1), 7-34. DOI: 10.1186/1471-2105-7-34.
- [57] SAMAGA, R. a KLAMT, S. Modeling approaches for qualitative and semi-quantitative analysis of cellular signaling networks. *Cell Communication and Signaling*. 2013, **11**(1), 11-43. DOI: 10.1186/1478-811X-11-43.

- [58] WITTMANN, D.M., KRUMSIEK, J., SAEZ-RODRIGUEZ, J., LAUFFENBURGER, D.A., KLAMT, S. a THEIS, F.J. Transforming Boolean models to continuous models: methodology and application to T-cell receptor signaling. *BMC Systems Biology*. 2009, **3**(1), 3-98. DOI: 10.1186/1752-0509-3-98.
- [59] CHAOUIYA, C. Petri net modelling of biological networks. *Briefings in Bioinformatics*. 2007, **8**(4), 210-219. DOI: 10.1093/bib/bbm029.
- [60] SACKMANN, A., HEINER, M. a KOCH, I. Application of Petri net based analysis techniques to signal transduction pathways. *BMC Bioinformatics*. 2006, **7**(1), 482-. DOI: 10.1186/1471-2105-7-482.
- [61] BLÄTKE, M.A. *Petri Nets in Systems Biology* [online]. 2011, 108 s. [cit. 2016-12-01]. Dostupné z: <http://www.regulationsbiologie.de/pdf/BlaetkeTutorial.pdf>
- [62] MATSUNO, H. Biopathways representation and simulation on hybrid functional Petri net. In: *In Silico Biology*. IOS Press, 2003.
- [63] FUMIÃ, H.F., MARTINS, M.L. a BRODY, J.P. Boolean Network Model for Cancer Pathways: Predicting Carcinogenesis and Targeted Therapy Outcomes. *PLoS ONE*. 2013-7-26, **8**(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0069008.
- [64] FAURÉ, A., NALDI, A., CHAOUIYA, C. a THIEFFRY, D. Dynamical analysis of a generic Boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *Bioinformatics*. 2006, **22**(14), e124-e131. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl210.
- [65] WEISWALD, L.B., BELLET, D. a DANGLES-MARIE, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*. 2015, **17**(1), 1-15. DOI: 10.1016/j.neo.2014.12.004.
- [66] GLAZIER, J.A. a GRANER, F. Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Physical Review E*. 1993, **47**(3), 2128-2154. DOI: 10.1103/PhysRevE.47.2128.
- [67] CHEN, N., GLAZIER, J.A., IZAGUIRRE, J.A. a ALBER, M.S. A parallel implementation of the Cellular Potts Model for simulation of cell-based morphogenesis. *Computer Physics Communications*. 2007, **176**(11-12), 670-681. DOI: 10.1016/j.cpc.2007.03.007.
- [68] BALDIN, V., LUKAS, J., MARCOTE, M.J., PAGANO, M. a DRAETTA, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes*. 1993, **7**(5), 812-821. DOI: 10.1101/gad.7.5.812.

- [69] QING, Y., YANG, X.Q., ZHONG, Z.Y., et al. Microarray analysis of DNA damage repair gene expression profiles in cervical cancer cells radioresistant to ²⁵²Cf neutron and X-rays. *BMC Cancer*. 2010, **10**(1). DOI: 10.1186/1471-2407-10-71.
- [70] NGUYEN, L.K., CAVADAS, M.A.S., SCHOLZ, C.C., et al. A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) network. *Journal of Cell Science*. 2013, **126**(6), 1454-1463. DOI: 10.1242/jcs.119974.
- [71] Cell diameter: Mammalian tissue culture cell (BNID 100432, Milo et al 2010). *BioNumbers Database* [online]. [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <http://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?id=100432&ver=3>
- [72] Základní typy (C++). *Microsoft Developer Network* [online]. [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: <https://msdn.microsoft.com/cs-cz/library/cc953fe1.aspx>
- [73] ABUD, H.E. Shaping developing tissues by apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 2004, **11**(8), 797-799. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401455.
- [74] BYKOV, V.J.N. a WIMAN, K.G. Mutant p53 reactivation by small molecules makes its way to the clinic. *FEBS Letters*. 2014, **588**(16), 2622-2627. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.04.017.
- [75] LABI, V. a ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. *Cell Death and Disease*. 2015-3-5, **6**(3), e1675. DOI: 10.1038/cddis.2015.20.
- [76] KRAFTS, K.P. Tissue repair. *Organogenesis*. 2014, **6**(4), 225-233. DOI: 10.4161/org.6.4.12555.
- [77] FISHER, S.A., LANGILLE, B.L. a SRIVASTAVA, D. Apoptosis During Cardiovascular Development. *Circulation Research*. 2000, **87**(10), 856-864. DOI: 10.1161/01.RES.87.10.856.
- [78] HEPG2 CELLS: HeLa Cell line characteristic. *Celeromics* [online]. [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: <http://www.celeromics.com/en/Support/cell-lines/HeLa.php>
- [79] GINSBURG, E., SALOMON, D., SREEVALSAN, T. a FREESE, E. Growth Inhibition and Morphological Changes Caused by Lipophilic Acids in Mammalian Cells. *Proc. Nat. Acad. Si. USA*. 1973, **70**(8), 2457-2461.
- [80] SATO, S., RANCOURT, A., SATO, Y. a SATOH, M.S. Single-cell lineage tracking analysis reveals that an established cell line comprises putative cancer stem cells and their heterogeneous progeny. *Scientific Reports*. 2016, **6**(1). DOI: 10.1038/srep23328.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CDK	<i>cyklin-dependentní kináza</i>
DNA	<i>deoxyribonukleová kyselina</i>
CDI	<i>inhibitor cyklin-dependentních kináz</i>
cAMP	<i>cyklický adenosinmonofosfát</i>
cAPK	<i>cAMP-dependentní protein kináza</i>
ATP	<i>adenosintrifosfát</i>
PKA	<i>protein kináza A</i>
PDK	<i>pyruvát dehydrogenáza kináza</i>
RTK	<i>tyrosinkinázový receptor</i>
GPCR	<i>G-protein-spřažený receptor</i>
PHD	<i>prolyl-hydroxyláza</i>
PDH	<i>pyruvát dehydrogenáza</i>
ROS	<i>reaktivní formy kyslíku</i>
EGF	<i>epidermální růstový faktor</i>
MAPK/K/KK	<i>mitogenem aktivovaná protein kináza (-kináza/ -kináza-kináza)</i>
ERK	<i>extracelulárním signálem regulovaná kináza</i>
ECM	<i>extracelulární matrix</i>
UV	<i>ultrafialové záření</i>
EGFR	<i>receptor epidermálního růstového faktoru</i>
ODE	<i>obyčejná diferenciální rovnice</i>
PDE	<i>parciální diferenciální rovnice</i>
PS	<i>Petriho síť</i>
CPM	<i>buněčný Potts model</i>
DPI	<i>počet bodů na pixel</i>

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1 – Obsah CD.....	I
Příloha č. 2 – Manuál k programu	II

Příloha č. 1 – Obsah CD

Stanislav Bělehrádek DP.pdf – elektronická verze diplomové práce

bunky.exe – program pro spouštění simulací kolonie buněk

kolonie.dat – soubor obsahující uloženou kolonii zobrazenou na Obr. 30

Zdrojové soubory – složka obsahující soubory:

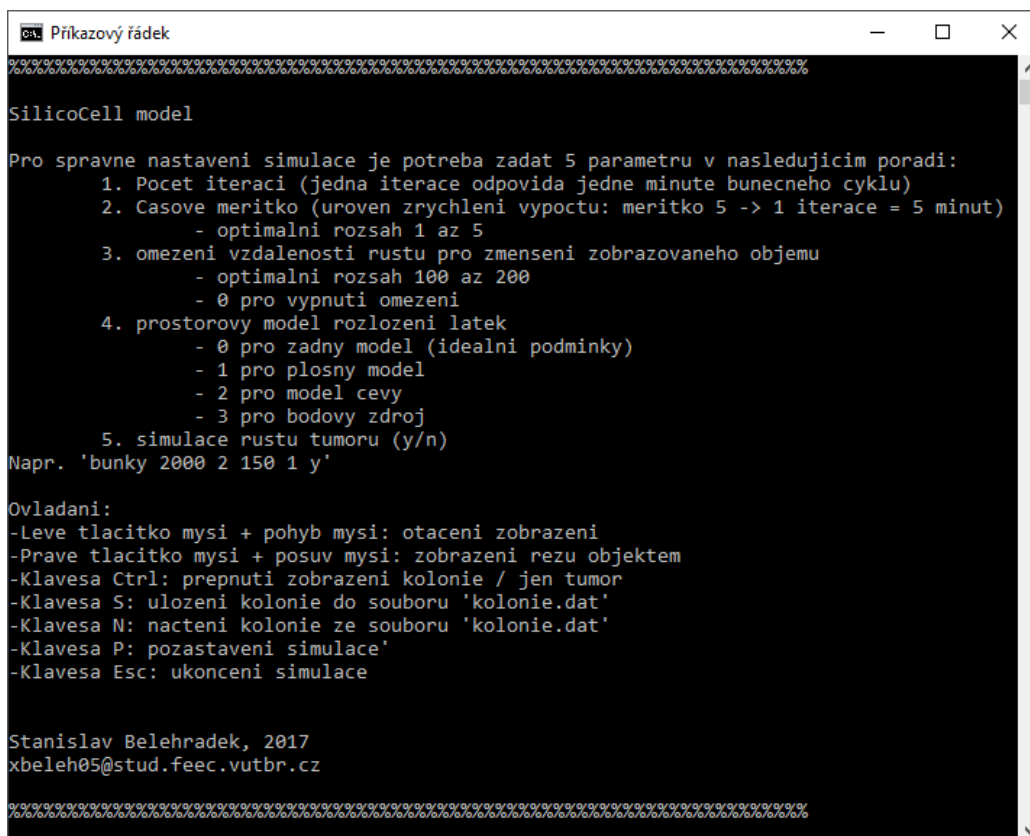
- main.cpp
- bunky.cpp
- bunky.h
- vypocty.cpp
- vypocty.h

Příloha č. 2 – Manuál k programu

Program *bunky.exe* je kompatibilní se systémy Microsoft Windows 7 a novější ve verzi 32bit i 64bit. Program je spouštěn pomocí Příkazové řádky, která se spouští příkazem `cmd` v okně vyvolaném klávesovou zkratkou **Win+R**. Poté je standardní navigací (např. příkazem `cd C://...cesta k souboru...`) nalezen adresář s programem *bunky.exe*.

První spuštění programu

Pro prvotní inicializaci programu je možné jej spustit i bez parametrů pouze jako *bunky*. Ve složce s programem jsou poté automaticky vytvořeny soubory *config.ini* s nastavením, *log.txt* s logovacími informacemi a *pocety.txt* s množstvím buněk v různých fázích. Zároveň je v příkazové řádce zobrazena stručná nápověda zobrazená na Obr. 26. Podrobnou nápovědu lze spustit příkazem `bunky -h` (Obrázek I). Zde je popsán formát a pořadí zadávaných parametrů včetně možného ovládání programu pomocí myši a klávesnice.



```
Příkazový řádek

SilicoCell model

Pro správné nastavení simulace je potřeba zadat 5 parametrů v následujícím pořadí:
  1. Počet iterací (jedna iterace odpovídá jedné minutě bunecného cyklu)
  2. Casové meritko (úroveň zrychlení výpočtu: meritko 5 -> 1 iterace = 5 minut)
     - optimální rozsah 1 až 5
  3. omezení vzdálenosti růstu pro zmenšení zobrazovaného objemu
     - optimální rozsah 100 až 200
     - 0 pro vypnutí omezení
  4. prostorový model rozložení lůtek
     - 0 pro žádný model (ideální podmínky)
     - 1 pro plošný model
     - 2 pro model cévy
     - 3 pro bodový zdroj
  5. simulace růstu tumoru (y/n)
Např. 'bunky 2000 2 150 1 y'

Ovládání:
-Levé tlačítko myši + pohyb myši: otáčení zobrazení
-Právé tlačítko myši + posuv myši: zobrazení řezu objektem
-Klávesa Ctrl: přepnutí zobrazení kolonie / jen tumor
-Klávesa S: uložení kolonie do souboru 'kolonie.dat'
-Klávesa N: načtení kolonie ze souboru 'kolonie.dat'
-Klávesa P: pozastavení simulace
-Klávesa Esc: ukončení simulace

Stanislav Belehradek, 2017
xbeleh05@stud.feec.vutbr.cz
```

Obrázek I – Nápověda programu

Nastavení a spuštění simulace

Spouštění simulace přednastavených režimů je velmi jednoduché – za název programu stačí zadat požadovaný režim, např. `bunky -p3`. Pro vlastní nastavení je nutné dodržet pořadí a rozsah jednotlivých parametrů.

Prvním zadávaným parametrem je počet prováděných iterací. Jedna iterace odpovídá jedné minutě v buněčném cyklu buňky. Zde je možné zadávat kladná celá čísla, nejlépe v rozmezí 1 000 – 10 000. Minimální hodnota je 1, při nižším počtu je automaticky nastaveno 1 000 iterací.

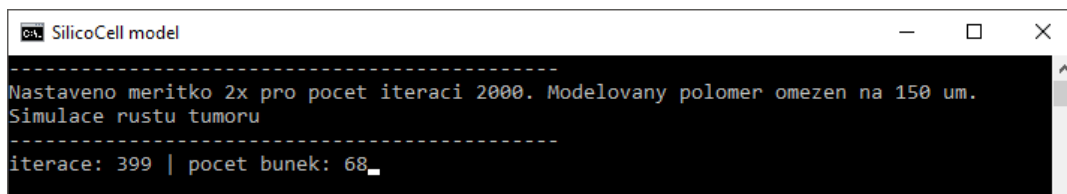
Druhým parametrem je časové měřítko pro urychlení kroku simulace. Při nastavení hodnoty 2,5 bude 1 iterace odpovídat 2,5 minutám v buněčném cyklu. Maximální možné zrychlení je 5x, minimální pak 1x. Při překročení rozsahu je zvoleno měřítko 1x.

Třetím zadávaným parametrem je omezení simulovaného prostoru. Hodnota je zadávána jako poloměr a v simulaci se projevuje jako pro buňky neprostupný válec nebo koule, v závislosti na nastaveném rozložení látek v prostoru. Zadát lze buď hodnotu 0 pro vypnutí omezení nebo libovolné reálné číslo pro požadovaný poloměr omezení.

Čtvrtým parametrem je výběr modelu rozložení látek v prostoru. Zadávat lze hodnoty 0, 1, 2 nebo 3 pro model ideální, plošný, bodový a pro cévu. Při volbě mimo povolený rozsah je zvolen model ideální.

Poslední parametr určuje, zda bude simulován růst tumoru. Možné volby jsou `-y` pro umístění buňky tumoru uprostřed kolonie a `-n` pro simulaci bez tumoru. Standardně je spouštěna simulace bez rakovinné buňky.

Spouštění simulace s 2 000 iteracemi, měřítkem 2, prostorovým omezením do vzdálenosti 150 μm , plošným modelem rozložení látek a s jednou buňkou tumoru tak má podobu `bunky 2000 2 150 1 y`. Při potvrzení nastavení klávesou **Enter** je otevřeno grafické okno s počáteční generovanou kolonií. Současně je přepnuto zobrazení v příkazové řádce, kde je zobrazeno zvolené nastavení, aktuální počet iterací a celkový počet buněk v kolonii (Obrázek II).



```
SilicoCell model
-----
Nastaveno meritko 2x pro pocet iteraci 2000. Modelovany polomer omezen na 150 um.
Simulace rustu tumoru
-----
iterace: 399 | pocet bunek: 68_
```

Obrázek II – Probíhající simulace

Prohlížení simulované kolonie

V grafickém okně lze zobrazenou kolonii pomocí levého tlačítka myši otáčet a sledovat tak růst buněk v prostoru. Pomocí pravého tlačítka myši je možné zobrazit řez kolonií pro sledování vnitřních struktur (Obrázek III). Pro přepínání mezi zobrazením všech buněk a samotného tumoru slouží levá klávesa **Ctrl**.

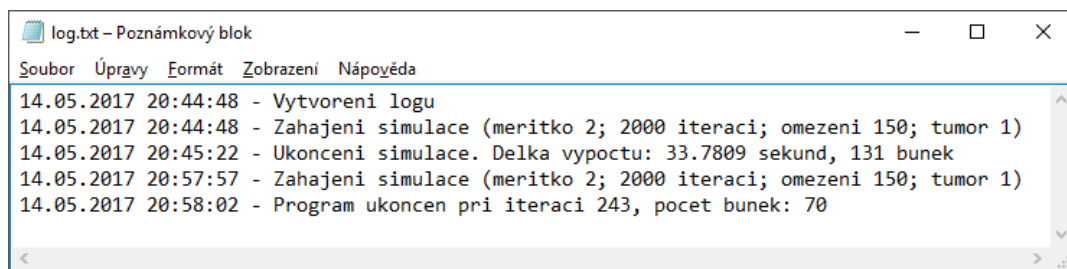


Obrázek III – Zobrazení kolonie buněk (vlevo) a řezu (vpravo)

Prohlížení a otáčení myší je možné v průběhu i na konci simulace, ale vzhledem k náročnosti výpočtů nemusí být v průběhu simulace zobrazení plynulé. Proto je vhodné simulaci pozastavit klávesou **P**. Opětovným stisknutím bude simulace pokračovat.

Obsah vytvářených souborů

Informace o čase spuštění, nastavení a délce simulace jsou ukládány do souboru *log.txt*. Obsah souboru po provedení dvou simulací je zobrazen na Obrázku IV. První simulace proběhla celá, druhá byla uživatelsky předčasně zastavena klávesou **Esc**.



Obrázek IV – Obsah souboru *log.txt*

Další vytvářený soubor je *pocty.txt*, do kterého jsou zapisovány počty buněk pro všechny provedené simulace. V jednotlivých sloupcích souboru jsou hodnoty ukládány v následujícím formátu:

Počet zdravých buněk	Počet buněk tumoru	Počet buněk ve fázi G ₀	Počet buněk ve fázi G ₁	Počet buněk v cyklu
-------------------------	-----------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	------------------------

Obsah souboru na rozmezí dvou provedených simulací je zobrazen na Obrázku V. Ukládán je i čas provedené simulace, aby bylo možné počty buněk přiřadit k informacím v logovacím souboru.

Soubor	Úpravy	Formát	Zobrazení	Nápověda
127	4	51	60	20
127	4	51	60	20
127	4	52	59	20
127	4	50	61	20
127	4	51	60	20
127	4	51	60	20
14.05.2017 20:58:02				
99	1	0	100	0
99	1	0	100	0
99	1	0	100	0

Obrázek V – Obsah souboru *pocety.txt*

Nejdůležitějším ukládaným souborem, který obsahuje veškeré informace o simulované kolonii, je *kolonie.dat*. Tento soubor je ukládán jen po stisknutí klávesy **S**. Údaje pro každou buňku jsou ukládány ve sloupcích v následujícím pořadí:

Poloha x
Poloha y
Poloha z
Poloměr r
Požadovaný r
Stav (fáze)
Krok růstu
Doba života
Délka cyklu
Trvání cyklu
Poškození
Práh apoptózy
Práh živin
Práh poškození
Práh dělení
Metabolismus
Počet dotyků
Překrytí
Buňka tumoru
Návrat do cyklu
Metabolity
Spotřeba živin

Poloha udává pozici v prostoru, poloměr určuje aktuální velikost buňky, požadovaný poloměr je vypočítán signálními drahami. Stav rozlišuje mezi apoptózou (-1), fází G_0 (0), G_1 (1) a buněčným cyklem (2). Krok růstu je meziiterační nárůst poloměru, doba života je délka existence buňky v simulaci, délka cyklu udává délku buněčného cyklu (součet S, G_2 a M), trvání cyklu je pomocná proměnná pro výpočet jednotlivých fází. Poškození vzniká např. toxiny a nabývá hodnot 0–1, práh apoptózy je zadán uživatelem v souboru *config.ini*, práh živin je nastaven na hodnotu 0,1 a práh poškození je také nastavitelný. Práh dělení určuje potřebné množství růstových faktorů, metabolismus je vypočítán podle Rovnice 4.7, počet dotyků odpovídá dotykům s okolím a překrytí součtu překryvů s okolními buňkami. Buňka tumoru je logickou hodnotou, návrat do cyklu rozhoduje o možnosti návratu z fáze G_0 , metabolity jsou množství ROS a spolu se spotřebou živin odpovídá metabolismu buňky. Obsah souboru *kolonie.dat* po otevření v Matlabu je zobrazen na Obrázku VI.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	16.4569	-6.0623	-27.5373	10.1863	10.1863	0	0.0057	2000	450	0	0.1446	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.7426	7	0.6548	0	0	0.0928	0.0928
2	-1.9502	14.3961	-28.9403	10.1620	10.1539	0	0.0058	1999	450	2	0.0836	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.6964	6	0.6255	0	0	0.0871	0.0871
3	32.3011	-14.6862	-18.3602	10.1565	10.1489	0	0.0058	1998	450	0	0.0948	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.6954	5	0.4164	0	0	0.0869	0.0869
4	-14.9305	12.9267	-13.5131	10.1502	10.1244	0	0.0056	1998	450	10	0.1815	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.7044	7	1.2452	0	0	0.0880	0.0880
5	-20.3581	-23.7961	2.5315	10.1000	10.1111	0	0.0057	1998	450	0	0.0657	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.6494	2	0.3099	0	0	0.0812	0.0812
6	21.7400	21.8542	20.6361	10.0995	10.1038	0	0.0059	2000	450	26	0.1187	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.6583	5	0.4451	0	0	0.0823	0.0823
7	11.1315	-15.2758	11.5004	10.1338	10.1472	0	0.0059	1998	450	28	0.1082	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.6918	3	0.3928	0	0	0.0865	0.0865
8	-22.3476	-3.7931	-2.6961	10.2279	10.2241	0	0.0057	1998	450	0	0.0680	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.7554	3	0.2231	0	0	0.0944	0.0944
9	41.3562	-5.8024	21.5509	10.1975	10.2098	0	0.0057	1998	450	68	0.1028	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.7443	6	0.4411	0	0	0.0930	0.0930
10	-20.3008	-23.6471	24.2245	10.0864	10.0907	1	0.0057	1998	450	27	0.1264	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.6496	2	0.6212	0	1	0.0812	0.0812
11	15.9038	-9.4071	-7.4602	10.1860	10.2070	0	0.0057	1999	450	10	0.0541	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.7241	0	0	0	0	0.0905	0.0905
12	25.8223	-1.3775	9.0672	10.2280	10.2255	0	0.0058	2000	450	56	0.1194	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.7696	6	0.4608	0	0	0.0962	0.0962
13	-42.6335	-2.5252	-5.0070	10.2148	10.2094	0	0.0059	2000	450	30	0.1325	0.0050	0.1000	0.5000	0.1000	0.7629	8	0.7628	0	0	0.0954	0.0954

Obrázek VI – Obsah souboru *kolonie.dat*

Posledním vytvořeným souborem je *config.ini* pro podrobné nastavení simulace. Obsah tohoto souboru (Obrázek VII) je již popsán v kapitole Uživatelské nastavení simulace. Při změně parametru *ukladani* na hodnotu 1 dojde při dalším spuštění simulace k ukládání snímků kolonie po každé 1 000 iteraci. Nejprve je však nutné v adresáři s programem *bunky.exe* vytvořit novou složku pojmenovanou *obr*.

```

=MAIN= 0
t_G1 540
t_S 600
t_G2 270
t_M 30
t_Apop 180
t_cekani 180
ukladani 0
korekce_r 2
=VYPOCTY= 1
prostor 100
pokles 0.2
=BUNKY= 2
kolonie 100
r_bunek 10
t_tumor 0.95
poc_dot 6
transport 0.8
oprava 0.001
rovina 0
supresory 0
poskozeni 0.5
prah_ap 0.005

```

Obrázek VII – Obsah souboru *config.ini*